

FUSIONES DE VARIANTE III DEL RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO-MESOTELINA Y MÉTODOS PARA USAR LOS MISMOS

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 62/146.559, presentada el 13 de abril de 2015, y de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 62/243.397, presentada el 19 de octubre de 2015. Las enseñanzas completas de las solicitudes anteriores se incorporan al presente documento por referencia.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE MATERIAL EN FORMATO DE TEXTO ASCII

La presente solicitud incorpora por referencia el Listado de Secuencias contenido en el siguiente archivo de texto ASCII que se remite de manera conjunta con el presente documento:

- a) Nombre del archivo: 53161000003Sequence.txt; creado el 8 de abril de 2016, con un tamaño de 45 KB.

CAMPO TÉCNICO

En el presente documento se proporcionan composiciones y métodos para desencadenar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En particular, la presente divulgación se refiere a proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de la variante III del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII) y un polipéptido de mesotelina, y a métodos para desencadenar una respuesta inmunitaria usando células hospedadoras que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas de fusión.

ANTECEDENTES

El cáncer de pulmón es la causa número uno de mortalidad por cáncer globalmente y tiene una incidencia estimada de 1,3 millones de nuevos casos cada año. En los estados Unidos, es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado, más de 200.000 personas son diagnosticadas cada año de esta enfermedad y es la principal causa de muertes relacionadas con el cáncer, estimándose que casi 160.000 sucumben a causa de la enfermedad cada año. Aproximadamente, de un 80% a un 85% de los nuevos casos diagnosticados de cáncer de pulmón son cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) (adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes) y un

de un 15% a un 20% son de carcinoma microcítico de pulmón. La resección quirúrgica es la opción más consistente y exitosa para la cura, pero requiere de un cáncer completamente reseccionable, lo que no es factible para la mayoría de pacientes, ya que el 70% de los pacientes presentan una enfermedad no
5 reseccionable y/o incurable.

Los avances en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer durante las últimas décadas han proporcionado mejoras sustanciales en los resultados, pero algunos tumores, tales como el NSCLC, siguen siendo difíciles de diagnosticar en un estadio temprano y la supervivencia general (SG) sigue
10 siendo escasa para pacientes que presentan inicialmente enfermedad avanzada o que progresan después de un tratamiento inicial. Se necesitan terapias adicionales para estos pacientes.

SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se divulgan proteínas de fusión que
15 comprenden un polipéptido de variante III de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII) fusionado a un polipéptido de mesotelina. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión pueden comprender uno o más polipéptidos de EGFRvIII, comprendiendo cada uno de estos una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99%
20 idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican las
25 proteínas de fusión divulgadas. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95%
30 idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

En el presente documento se divulgan células hospedadoras que comprenden las moléculas de ácido nucleico divulgadas. En algunas realizaciones, las células hospedadoras pueden comprender una molécula de
35 ácido nucleico que comprende uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son

al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

También se proporcionan métodos para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico puede comprender uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

También se divulgan métodos para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina que comprenden expresar en una célula hospedadora una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de EGFRvIII y un polinucleótido de mesotelina que codifica al polipéptido de mesotelina. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

También se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un sujeto que necesite tratamiento. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión que comprende uno o más polipéptidos de EGFRvIII, comprendiendo cada uno de los cuales una

secuencia de ácido nucleico al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico puede comprender uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El sumario, así como la siguiente descripción detallada, se entenderá adicionalmente cuando se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar las composiciones y métodos divulgados, se muestran en los dibujos realizaciones ejemplares de las composiciones y métodos; sin embargo, las composiciones y métodos no están limitados a las realizaciones específicas divulgadas. En los dibujos:

La FIG. 1, que comprende la FIG. 1A y FIG. 1B, ilustra un esquema ejemplar de (A) EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ (también citado en el presente documento como ADU-214) y (B) CRS-207 (mostrado por referencia).

La FIG. 2 ilustra la expresión de ADU-214 en caldo de cultivo. EGFRvIII-Meso = proteína de fusión ADU-214; Meso = proteína de fusión CRS-207. Lm11 se usó como control negativo.

La FIG. 3, que comprende la FIG. 3A y FIG. 3B, ilustra una respuesta inmunitaria de células T específica de antígeno en ratones vacunados. (A) ADU-214 indujo respuestas inmunitarias robustas mediadas por células T específicas de mesotelina en ratones Balb/c. (B) ADU-214 indujo respuestas inmunitarias robustas de células T CD8⁺ específicas de EGFRvIII en ratones C3H/HeN.

La FIG. 4 ilustra la inmunidad protectora de la vacunación con ADU-214 frente a una exposición a *Listeria* de tipo silvestre.

La FIG. 5 ilustra la vacunación terapéutica con ADU-214. Se usaron HBSS y cepa de plataforma vacía como controles.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las composiciones y métodos divulgados pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada, tomada en conexión con las figuras adjuntas, que forman una parte de la divulgación. Debe entenderse que las composiciones y métodos divulgados no están

5 limitados a las composiciones y métodos específicos descritos y/o mostrados en el presente documento, y que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares a modo solo de ejemplo y no pretende ser limitante de las composiciones y métodos reivindicados.

10 Salvo que se indique específicamente de otra forma, cualquier descripción acerca de un mecanismo o modo de acción posible o motivo para la mejora pretende ser solo ilustrativo, y las composiciones y métodos no deben estar restringidos a la corrección o incorrección de cualquiera de dichos mecanismos o modos de acción sugeridos o motivo de mejora.

15 A lo largo de este texto, las descripciones se refieren a composiciones y a métodos para usar dichas composiciones. En los casos donde la divulgación describe o reivindica una característica o realización relacionada con una composición, dicha característica o realización es igualmente aplicable a los métodos para el uso de dicha composición. Del mismo modo, en los casos

20 donde la divulgación describe o reivindica una característica o realización asociada con un método para usar una composición, dicha característica o realización es igualmente aplicable a la composición.

Debe apreciarse que determinadas características de las composiciones y métodos divulgados que, por claridad, se describen en el presente

25 documento en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, varias características de las composiciones y métodos divulgados que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación.

30 Como se usa en el presente documento, las formas del singular "un", "una", "el" y "la" incluyen el plural.

Las siguientes abreviaturas se usan a lo largo de la divulgación: EGFRvIII (región de unión a neoantígeno de la variante III del receptor de factor de crecimiento epidérmico); EGFRvIIIx5 (5 copias de EGFRvIII); Meso (mesotelio); ADU-214 (EGFRvIIIx5-mesotelina³⁵⁻⁶²²); Lm (Listeria

35

monocytogenes); LADD (*Listeria monocytogenes* doblemente eliminada).

El símbolo delta (Δ o "DELTA") se refiere a una eliminación. Por ejemplo, " Δ actA" (o "DELTAactA") significa que la totalidad, o parte, del gen actA está eliminada.

5 El término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a intervalos numéricos, valores de corte, o valores específicos se usa para indicar que los valores citados pueden variar hasta en un 10% respecto del valor listado. Por lo tanto, el término "aproximadamente" se usa para abarcar variaciones de $\pm$ 10 % o menos, variaciones de $\pm$ 5 % o menos, variaciones de $\pm$ 1% o menos, 10 variaciones de $\pm$ 0,5% o menos, o variaciones de $\pm$ 0,1% o menos respecto del valor especificado.

El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo humano o no humano. Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en el presente documento son aplicables a 15 enfermedades tanto humanas como veterinarias. En determinadas realizaciones, los sujetos son "pacientes", es decir, seres humanos vivos que reciben cuidados médicos para una enfermedad o afección. Esto incluye personas sin una enfermedad definida que están siendo investigadas respecto de signos patológicos. Se prefieren sujetos que tienen una neoplasia que 20 expresan uno o más, y preferentemente cada uno de, EGFRvIII y mesotelina. En determinadas realizaciones, el sujeto padece cáncer de pulmón, y preferentemente, adenocarcinoma no microcítico de pulmón (NSCLC) avanzado (estadio IIIb) o metastásico (estadio IV).

Las expresiones "por ciento idéntica", "identidad de secuencia" e 25 "porcentaje de identidad", tal como se usan en el presente documento, se refieren al tanto por ciento de aminoácidos que son iguales (es decir, idénticos) entre dos o más polipéptidos. La identidad de secuencia entre dos o más polipéptidos puede determinarse alineando las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y puntuando el número de posiciones en los polipéptidos 30 alineados que contienen el mismo resto de aminoácido y comparando este con el número de posiciones en los polipéptidos alineados que difieren. Los polipéptidos pueden diferir en una posición, por ejemplo, conteniendo un aminoácido diferente (es decir, sustitución o mutación) o careciendo de un aminoácido (es decir, inserción de aminoácidos o eliminación de aminoácidos 35 en uno o ambos polipéptidos). La identidad de secuencia puede calcularse

dividiendo el número de posiciones que contienen el mismo resto de aminoácido entre el número total de restos de aminoácidos en el polipéptido. El porcentaje de identidad, por ejemplo, puede calcularse dividiendo el número de posiciones que contienen el mismo resto de aminoácido entre el número total de restos de aminoácidos en el polipéptido y multiplicando por 100.

Un "fragmento inmunogénico de las mismas" incluyen porciones de proteínas de fusión que son capaces de provocar una respuesta inmunogénica en un sujeto. En algunos aspectos, el fragmento inmunogénico comprende, consiste en, o consiste esencialmente en EGFRvIII-mesotelina. En otros aspectos, el fragmento inmunogénico comprende, consiste en, o consiste esencialmente en secuencia o secuencias de señal-EGFRvIII-mesotelina.

Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión" se refiere a una proteína producida mediante la unión de dos o más polipéptidos. Las proteínas de fusión pueden generarse conjugando químicamente los polipéptidos. Preferentemente, las proteínas de fusión se generan mediante fusión genética, en la que las moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos individuales se unen en fase, de tal forma que la transcripción y la traducción de las moléculas de ácido nucleico genera una sola proteína que comprende los polipéptidos individuales. Las proteínas de fusión divulgadas pueden tener uno o más restos enlazadores entre los polipéptidos.

Tal como se usa en el presente documento, la "secuencia de señal" se refiere a secuencias de polipéptido, y a las secuencias de nucleótidos que codifican a las mismas, que funcionan dirigiendo la secreción de la proteína de fusión. La secuencia de señal se une operativamente al polipéptido o a los polipéptidos que comprenden la proteína de fusión y está en fase de lectura traduccional respecto de los polipéptidos que comprenden la proteína de fusión. Las "secuencias de señal" también pueden citarse como "secuencias de señal secretora".

Tal como se usa en el presente documento, "unido operativamente" se refiere a la yuxtaposición de secuencias de control, tal como un promotor de sitio de unión a ribosoma de tal modo que se mantiene la función normal de los componentes. Las "secuencias de control" se refieren típicamente a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en el organismo hospedador. Las secuencias de control pueden incluir un promotor, un sitio de unión a ribosoma y, opcionalmente, una

secuencia de Shine/Dalgarno. Por lo tanto, una secuencia codificante "unida operativamente" a una secuencia de señal codificada se refiere a una configuración en donde la secuencia codificante se une a la secuencia de señal de tal modo que el péptido de señal se procesa por la célula hospedadora y se secreta la proteína procesada. Una secuencia de señal unida operativamente a un promotor se une al promotor de tal modo que la transcripción y traducción de la secuencia de señal de secreción está controlada por el promotor, un sitio de unión a ribosomas, y secuencia de Shine/Dalgarno en caso necesario.

Tal como se usa en el presente documento "i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica" abarca al menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica al artículo de referencia (por ejemplo, una secuencia biológica).

Para los polipéptidos de EGFRvIII y las proteínas de fusión inmunogénicas que contienen a los mismos, cualquier variabilidad de secuencia descrita en el presente documento tiene que tener lugar fuera de los restos de aminoácido 7 a 14 de la SEQ ID NO: 9 (EEKKGNVYV). En otras palabras, la variabilidad de secuencia puede tener lugar en los restos de aminoácido 1 a 6 de la SEQ ID NO: 9 (PASRAL) o proteínas de fusión inmunogénicas que contienen a la misma y/o los restos de aminoácido 15 a 21 de la SEQ ID NO: 9 (VTDHGSC) o proteínas de fusión inmunogénicas que contienen a la misma. Por ejemplo, un polipéptido de EGFRvIII que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEQ ID NO: 9, abarca secuencias de aminoácidos que son un 90% idénticas, un 91% idénticas, un 92% idénticas, un 93% idénticas, un 94% idénticas, un 95% idénticas, un 96% idénticas, un 97% idénticas, un 98% idénticas, un 99% idénticas, o un 100% idénticas a la SEQ ID NO: 9, en donde la variabilidad tiene lugar en los restos 1 a 6 o 15 a 21 de la SEQ ID NO: 9. Por consiguiente, cada polipéptido de EGFRvIII y proteína de fusión inmunogénica que contiene al mismo contendrá los restos de aminoácido 7 a 14 de la SEQ ID NO: 9 (EEKKGNVYV).

Los polipéptidos de EGFRvIII pueden ajustarse en longitud para incluir porciones más cortas de la SEQ ID NO: 9. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido de EGFRvIII puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos al menos un 90%

idéntica a los restos de aminoácidos 6 a 18 de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, las una o más copias del polipéptido de EGFRvIII pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a los restos de aminoácidos 6 a 14 de la SEQ ID NO: 9. Como se ha descrito anteriormente, la variabilidad en estos polipéptidos más cortos tendrá lugar en los restos de aminoácido 1 a 6 o 15 a 21 de la SEQ ID NO: 9. Por consiguiente, para una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a los restos de aminoácidos 6 a 18 de la SEQ ID NO: 9, la variabilidad puede tener lugar en los restos de aminoácidos 6 o 15 a 18 de la SEQ ID NO: 9. Para una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a los restos de aminoácidos 6 a 14 de la SEQ ID NO: 9, la variabilidad puede tener lugar en el resto de aminoácido 6.

Las proteínas de fusión divulgadas pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en un antígeno de EGFRvIII y un antígeno de mesotelina. Los antígenos descritos en el presente documento pueden incluir una secuencia que es un epítipo del CMH de clase I o un epítipo del CMH de clase II de la secuencia de proteína de longitud completa. En una realización, un polinucleótido de EGFRvIII descrito comprende una secuencia que codifica al menos un epítipo de CMH de clase I o al menos un epítipo de CMH de clase II. Análogamente, los polipéptidos de EGFRvIII descritos en el presente documento incluyen al menos un epítipo de CMH de clase I o al menos un epítipo de CMH de clase II. En una realización, un polinucleótido de mesotelina descrito comprende una secuencia que codifica al menos un epítipo de CMH de clase I o al menos un epítipo de CMH de clase II. Análogamente, los polipéptidos de mesotelina descritos en el presente documento incluyen al menos un epítipo de CMH de clase I o al menos un epítipo de CMH de clase II.

EGFR es un receptor de tirosina cinasa crítico para el crecimiento y la supervivencia celular. El gen de EGFR con frecuencia está sobreexpresado o mutado en los cánceres humanos, incluyendo de cabeza y cuello, colon, páncreas, mama, de ovario, riñón, y gliomas malignos. La variante III del receptor de EGFR (EGFRvIII) es el resultado de la eliminación de 267 aminoácidos de los exones 2 a 7 y de la fusión del exón 1 con el exón 8, proporcionando un péptido específico de tumores con una nueva glicina en la unión. EGFRvIII muestra señalización constitutiva, independiente de ligando.

La mesotelina es una glucoproteína de la superficie celular unida a glucosilfosfatidilinositol que está presente en células mesoteliales normales que revisten a la pleura, el peritoneo, y el pericardio. La mesotelina es también un antígeno asociado a tumores que está elevadamente expresado por varios tumores humanos, incluyendo adenocarcinomas pancreáticos, mesotelioma, NSCLC, y cánceres de ovario.

El algoritmo predictivo "BIMAS" clasifica los epítomos de unión a HLA potenciales de acuerdo con el semitiempo de desasociación predictivo de los complejos péptido/HLA. El algoritmo "SYFPEITHI" clasifica a los péptidos de acuerdo con una puntuación que tiene en cuenta la presencia de restos de anclaje de unión a HLA primarios y secundarios. Ambos algoritmos computarizados puntúan a los epítomos candidatos basándose en secuencias de aminoácidos en una proteína dada que tienen motivos de unión similares a los epítomos de unión a HLA previamente publicados. También pueden usarse otros algoritmos para identificar candidatos para ensayos biológicos adicionales.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos ejemplares de las proteínas de fusión y de las porciones de antígenos de dichas proteínas de fusión, así como las moléculas de ácido nucleico que codifican a las mismas, se proporcionan en la tabla 2.

Proteínas de fusión

En el presente documento se divulgan proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de variante III de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII) fusionado a un polipéptido de mesotelina (proteínas de fusión EGFRvIII-mesotelina).

La proteína de fusión puede comprender una o más copias de un polipéptido de EGFRvIII. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido de EGFRvIII. En otras realizaciones, la proteína de fusión puede comprender una pluralidad de polipéptidos de EGFRvIII. El número de copias adecuado del polipéptido de EGFRvIII incluye, pero sin limitación, 2, 3, 4, 5, o más copias. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender una copia del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx1). En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender dos copias del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx2). En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender tres copias del polipéptido de EGFRvIII

(EGFRvIIIx3). En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender cuatro copias del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx4). En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender cinco copias del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx5).

5 En algunos aspectos, cada una de las una o más copias del polipéptido de EGFRvIII puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 9. En algunas
10 realizaciones, por ejemplo, el polipéptido de EGFRvIII puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones, el polipéptido de EGFRvIII puede comprender 2, 3, 4, 5, o más copias de un polipéptido de EGFRvIII, teniendo cada copia una secuencia de aminoácidos al menos un
15 90% idéntica a la SEQ ID NO: 9.

 En algunos aspectos, cada una de las una o más copias del polipéptido de EGFRvIII puede consistir en una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98%
20 idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, cada una de las una o más copias del polipéptido de EGFRvIII puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica,
25 un 99% idéntica, o un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 9.

 En algunas realizaciones, las una o más copias del polipéptido de EGFRvIII pueden comprender, consistir en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a los restos de aminoácidos 6 a 18 de la SEQ ID NO: 9. En
30 algunas realizaciones, las una o más copias del polipéptido de EGFRvIII pueden comprender, consistir en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a los restos de aminoácidos 6 a 14 de la SEQ ID NO: 9.

 Los polipéptidos de EGFRvIII pueden estar flanqueados por una o más
35 secuencias escisoras en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal, en el

extremo tanto N como C-terminal del polipéptido de EGFRvIII. Las secuencias escisoras están configuradas para procesarse por proteasas presentes en el sujeto. En los casos donde el polipéptido de EGFRvIII comprende 2 o más copias del polipéptido de EGFRvIII, las secuencias escisoras pueden estar

5 presentes entre copias individuales de los polipéptidos de EGFRvIII. Por ejemplo, y sin pretender ser limitantes, la SEQ ID NO: 10 contiene 5 copias del polipéptido de EGFRvIII (cada copia del polipéptido de EGFRvIII expuesta en la SEQ ID NO: 9) y secuencias escisoras (ASKVL/ADGSVKTS (SEQ ID NO: 26), ASKVA/GDGSIK (SEQ ID NO: 27), LSKVL/ADGSVK (SEQ ID NO: 28),

10 ASKVA/GDGSIK (SEQ ID NO: 29), y LSKVL/ADGSVK (SEQ ID NO: 30); en donde "/" representa al polipéptido de EGFRvIII). Estas secuencias escisoras son únicamente de naturaleza ejemplar. Las secuencias escisoras adecuadas se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 13/988.076 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2014/037662); Toes, et al., J.

15 Exp. Med. (2001) 194: 1-12; Lauer et al., Infect. Immun. (2008) 76: 3742-53; y Sinnathamby et al., J. Immunother. (2009) 32: 856-69, cada una de las cuales se incorporan por referencia en su totalidad.

El polipéptido de EGFRvIII puede encontrarse en N-terminal o en C-terminal respecto del polipéptido de mesotelina. En algunas realizaciones, el

20 polipéptido de EGFRvIII puede encontrarse en N-terminal respecto del polipéptido de mesotelina.

Los polipéptidos de mesotelina adecuados incluyen polipéptidos de mesotelina que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a los aminoácidos 35-

25 622 de mesotelina (citada en el presente documento como "mesotelina₃₅₋₆₂₂").

En algunos aspectos, el polipéptido de mesotelina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un

30 100% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el polipéptido de mesotelina puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, el polipéptido de mesotelina puede

35 consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica,

un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, el polipéptido de mesotelina puede consistir

5 esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

10 La proteína de fusión puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en uno o más polipéptidos de EGFRvIII comprendiendo cada uno de los cuales una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de

15 aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. La proteína de fusión puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en un polipéptido de EGFRvIIIx5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un

20 99% idéntica a EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender, consistir en, o consiste

25 esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8. Por ejemplo, en algunos aspectos, la proteína de fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica,

30 un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, la proteína de fusión puede consistir en una secuencia de aminoácidos que es al

35 menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un

94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, la proteína de fusión puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica, un 91% idéntica, un 92% idéntica, un 93% idéntica, un 94% idéntica, un 95% idéntica, un 96% idéntica, un 97% idéntica, un 98% idéntica, un 99% idéntica, o un 100% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8.

Las proteínas de fusión divulgadas pueden comprender además una secuencia de señal. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal es una fase de lectura traduccional con el polipéptido de EGFRvIII y el polipéptido de mesotelina. Las secuencias de señal adecuadas incluyen, por ejemplo, ActAN100 (tal como se expone en la SEQ ID NO: 32), ActAN100* (tal como se expone en la SEQ ID NO: 12), LLO441 (tal como se expone en la SEQ ID NO: 20), LLO441ΔPEST (tal como se expone en la SEQ ID NO: 22), y LLO441Δ26 (tal como se expone en la SEQ ID NO: 24). En algunas realizaciones, la secuencia de señal puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100 tal como se expone en la SEQ ID NO: 32. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la secuencia de señal ActAN100* tal como se expone en la SEQ ID NO: 12. Por consiguiente, la proteína de fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento inmunogénico de la misma. En otros aspectos, la proteína de fusión puede consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento inmunogénico de la misma. En otros aspectos más, la proteína de fusión puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90%

idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina³⁵⁻⁶²² tal como se expone en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento inmunogénico de la misma.

Las proteínas de fusión divulgadas pueden expresarse en una serie de células hospedadoras adecuadas, tal como se divulga en otras partes del presente documento. En algunas realizaciones, por ejemplo, la proteína de fusión puede expresarse en una bacteria, tal como *Listeria monocytogenes* o una forma modificada genéticamente de la misma.

Las proteínas de fusión divulgadas pueden usarse como polipéptidos inmunogénicos para desencadenar una respuesta humoral, una respuesta de células T (CD4+ y/o CD8+) específica de antígeno, o ambas en un sujeto que recibe la proteína de fusión.

Moléculas de ácido nucleico

En el presente documento se divulgan moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de EGFRvIII-mesotelina. Las moléculas de ácido nucleico divulgadas pueden codificar cualquiera de las proteínas de fusión EGFRvIII-mesotelina divulgadas en el presente documento.

A lo largo de la divulgación, se describen proteínas de fusión EGFRvIII-mesotelina que comprenden, y ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas de fusión que comprenden, uno o más polipéptidos de EGFRvIII. El polipéptido de EGFRvIII puede estar codificado por una cualquiera de las secuencias de nucleótido de EGFRvIII proporcionadas en la tabla 1. Por consiguiente, a lo largo de la divulgación, cuando se cita que el polipéptido de EGFRvIII es "al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 4" (la secuencia consenso en la tabla 1), se pretende incluir: al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 13; al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 14; al menos un 90% idéntico a la SEQ ID NO: 15; al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 16; y/o al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 17. Análogamente, las secuencias de nucleótido que codifican las diversas proteínas de fusión inmunogénicas pueden comprender una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-17. Por lo tanto, cada proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina proporcionada en el presente documento puede estar codificada por una molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico comprende

- uno o más polinucleótidos que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos a la SEQ ID NO: 13, al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos a la SEQ ID NO: 14, al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos a la SEQ ID NO: 15, al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos a la SEQ ID NO: 16, y/o al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos a la SEQ ID NO: 17.

Tabla 1

Secuencias de nucleótidos de EGFRvIII	
repetición 1 (SEQ ID NO: 13)	1 (1) CCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTACGTGGTGACGGATCATGGATCGTGT 63
repetición 2 (SEQ ID NO: 14)	(1) CCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAGGAACTATGTTGTGACCGATCATGGTAGCTGC
repetición 3 (SEQ ID NO: 15)	(1) CCAGCATCTAGAGCTTTAGAGGAAAAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCATGGAAGTTGT
repetición 4 (SEQ ID NO: 16)	(1) CCAGCTTCTCGCGCATTAGAAGAAAAGAAAGCAATTATGTTGTAACAGACCATGGTAGTTGT
repetición 5 (SEQ ID NO: 17)	(1) CCGGCTTCTCGTGCCTAGAAAGAGAAGAAAGGAAATTACGTAGTTACAGACCACGGCTCTTGC
Consenso (SEQ ID NO: 4)	(1) CCdGCwwswmGhGCdyTwGARGARAArAArGGnAAyTAyGTnGTdACvGAyCAyGGhwsbTGy

La molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión EGFRvIII- mesotelina con uno o más polipéptidos de EGFRvIII. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina con un polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx1). En

5 otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina con una diversidad de polipéptidos de EGFRvIII. Los números adecuados de polipéptidos de EGFRvIII codificados por las moléculas de ácido nucleico divulgadas incluyen, pero sin limitación, 2, 3, 4, 5, o más copias. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico

10 pueden codificar una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina con 2 copias del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx2). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden codificar una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina con 3 copias del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx3). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden codificar una proteína de

15 fusión EGFRvIII-mesotelina con 4 copias del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx4). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden codificar una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina con 5 copias del polipéptido de EGFRvIII (EGFRvIIIx5).

Una secuencia ejemplar de un polinucleótido de EGFRvIII que codifica al

20 polipéptido de EGFRvIII se expone en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico divulgadas pueden comprender uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 4. Una secuencia de ácido nucleico

25 ejemplar de un polinucleótido de EGFRvIIIx5 que codifica al polipéptido de EGFRvIIIx5 se expone en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico divulgadas pueden comprender un polinucleótido de EGFRvIIIx5 que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID

30 NO: 5.

Los polipéptidos de mesotelina adecuados codificados por las moléculas de ácido nucleico incluyen mesotelina₃₅₋₆₂₂. La secuencia de ácido nucleico de mesotelina₃₅₋₆₂₂ se expone en la SEQ ID NO: 6. Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico divulgadas pueden codificar a una proteína de fusión de

35 EGFRvIII-mesotelina, en donde el polipéptido de mesotelina está codificado por

un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina³⁵⁻⁶²² tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina³⁵⁻⁶²² tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina³⁵⁻⁶²² tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido de EGFRvIIIx5-mesotelina³⁵⁻⁶²² que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 7.

Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender adicionalmente un promotor, una secuencia de señal, o ambas. Las secuencias de señal pueden usarse para dirigir la secreción de las proteínas de fusión codificadas por una célula hospedadora. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, actA (tal como se expone en la SEQ ID NO: 2) o hly (tal como se expone en la SEQ ID NO: 18). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender adicionalmente un promotor, en donde el promotor comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica al promotor actA tal como se expone en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender adicionalmente un promotor, en donde el promotor comprende una secuencia de nucleótido que es al menos un 90% idéntica al promotor hly tal como se expone en la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender una secuencia de señal que está en fase traduccional con la secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido de EGFRvIII y la secuencia de nucleótido que codifica al polipéptido de mesotelina. Las secuencias de señal pueden usarse para dirigir la secreción de

las proteínas de fusión codificadas por una célula hospedadora. Las secuencias de señal adecuadas incluyen, por ejemplo, ActAN100 (tal como se expone en la SEQ ID NO: 31), ActAN100* (tal como se expone en la SEQ ID NO: 3), LLO441 (tal como se expone en la SEQ ID NO: 19), LLO441ΔPEST (tal como se expone en la SEQ ID NO: 21), y LLO441Δ26 (tal como se expone en la SEQ ID NO: 23). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal puede comprender una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la secuencia de señal ActAN100 tal como se expone en la SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal puede comprender una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la secuencia de señal ActAN100* tal como se expone en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal puede comprender una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la secuencia de señal LLO441 tal como se expone en la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal puede comprender una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la secuencia de señal LLO441ΔPEST tal como se expone en la SEQ ID NO: 21. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal puede comprender una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la secuencia de señal LLO441Δ26 tal como se expone en la SEQ ID NO: 23. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a los partes de bases actAp-ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se exponen en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión

comprende uno o más polipéptidos de EGFRvIII, comprendiendo cada uno de los cuales una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende un polipéptido de EGFRvIIIx5 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en los restos de aminoácido 89 a 840 en la SEQ ID NO: 8.

Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además secuencias de ácido nucleico adicionales que incluyen, pero sin limitación, sitios de escisión de endonucleasas de restricción (engarces de clonación). Las moléculas de ácido nucleico pueden generarse usando una serie de endonucleasas de restricción adecuadas, en donde los sitios de restricción de endonucleasas permanecen en la molécula de ácido nucleico final. La SEQ ID NO: 1 incluye un engarce de clonación BamHI (GGATCC) y un engarce de clonación MfeI (CAATTG). Un experto en la materia sabrá que pueden usarse otros engarces de clonación en lugar de bamHI y/o MfeI.

Las secuencias de ácido nucleico adicionales que pueden incluirse en las moléculas de ácido nucleico incluyen "secuencias de escisión" (tal como se describen en otras partes del presente documento) que flanquean a los polinucleótidos de EGFRvIII individuales.

La molécula de ácido nucleico puede ser parte de un casete de expresión. El casete de expresión puede comprender un promotor, una fase

abierta de lectura que comprende las moléculas de ácido nucleico divulgadas, y una región 3' no traducida. El casete de expresión puede usarse para dirigir la maquinaria de la célula hospedadora para producir las proteínas de fusión divulgadas.

- 5 También se proporcionan vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico divulgadas. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores bacterianos, vectores víricos, vectores de ADN desnudo, y vectores de ARN desnudo.

Células hospedadoras

- 10 También se proporcionan células hospedadoras que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento.

- Las células hospedadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, bacterias. Las células hospedadoras pueden estar atenuadas, ser comensales, y/o estar
- 15 muertas, pero metabólicamente activas. En una realización ejemplar, las células hospedadoras pueden ser bacterias atenuadas, ser comensales, y/o estar muertas, pero metabólicamente activas. Las bacterias adecuadas incluyen, pero sin limitación, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* o especies de *mycobacterium*, o formas modificadas de las mismas. En
- 20 algunas realizaciones, por ejemplo, la célula hospedadora puede ser *Listeria monocytogenes* o una forma modificada de la misma. Las modificaciones incluyen mutaciones, alteraciones, y otros cambios/variaciones genéticas, así como tratamiento por calor y modificación química, que reducen la toxicidad de
- 25 la célula hospedadora para un sujeto. La bacteria puede modificarse, por ejemplo, para reducir la unión a células en un sujeto, reducir la dispersión de una célula a otra en un sujeto, reducir el crecimiento extracelular en un sujeto, o reducir el crecimiento intracelular en un sujeto.

- Las cepas bacterianas adecuadas como células hospedadoras incluyen
- 30 aquellas descritas en la Solicitud de patente de Estados Unidos n.º 13/988.076 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2014/037662), incorporada al presente documento por referencia en su totalidad. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una cepa viva-atenuada de *L. monocytogenes* que está modificada genéticamente para que comprenda una mutación atenuante
- 35 en *actA* y/o *inlB*, y preferentemente una eliminación de la totalidad o una parte

de actA y inlB (citada en el presente documento como “Lm Δ actA/ Δ inlB”), y contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina. En algunas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante de eliminación de actA (Δ actA), un mutante de inserción de actA, un mutante de eliminación de inlB (Δ inlB), y un mutante de inserción de inlB, o una de sus combinaciones. Por ejemplo, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante Δ actA/ Δ inlB.

Las células hospedadoras pueden comprender moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico está integrada en el genoma de la célula hospedadora. Las moléculas de ácido nucleico pueden integrarse en el locus de actA, el locus de inlB o el locus de ARNtArg. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de actA. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de inlB. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de ARNtArg. Dichas células hospedadoras contienen ácidos nucleicos que se encuentran bajo el control de las secuencias de expresión de la célula hospedadora y de este modo no requieren de elementos transcripcionales o traduccionales de eucariotas.

Las células hospedadoras pueden comprender la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico se encuentra en la célula hospedadora de manera extracromosómica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina puede insertarse en un casete de expresión en un plásmido episómico dentro de la célula hospedadora.

En el presente documento se proporcionan bacterias de *Listeria* que están modificadas para que comprendan cualquiera de las moléculas de ácido nucleico divulgadas. La molécula de ácido nucleico puede estar presente en la *Listeria* de manera extracromosómica, o puede estar integrada en el genoma bacteriano. En algunas realizaciones, por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una *Listeria monocytogenes* mutante de Δ actA/ Δ inlB que tiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina integrada en el locus de ARNtArg. La *Listeria* puede utilizarse como plataforma de expresión para expresar las proteínas de fusión divulgadas que

son heterólogas para la célula hospedadora. Dicha expresión puede dar lugar a, por ejemplo, una respuesta inmunitaria para la proteína de fusión heteróloga en un sujeto que contiene a la célula hospedadora.

ADU-214 es una cepa viva atenuada de Lm (Lm Δ actA/ Δ inlB) diseñada por ingeniería genética para expresar EGFRvIII y mesotelina. La expresión de EGFRvIII-hMeso está dirigida por el promotor actA de Lm, que está elevadamente inducido cuando la Lm ha infectado a las células hospedadoras. El gen actA reside en el regulón PrfA, una serie de genes de virulencia de Lm cuya expresión está controlada e inducida por PrfA, una proteína activadora transcripcional que está inducida en el contexto de la célula hospedadora infectada. El casete de expresión de EGFRvIII-mesotelina en ADU-214 utiliza exclusivamente la maquinaria de transcripción, traducción y secreción de Lm y no contiene ningún elemento de expresión de mamífero (tal como regiones promotoras o terminadoras características de los sistemas de expresión de mamífero). Por lo tanto, a diferencia de los vectores basados en ADN de plásmido o víricos que tienen que utilizar la maquinaria de la célula hospedadora de mamífero para expresar un gen de interés determinado, y por definición, donde la transferencia génica es un requisito previo para la expresión génica, Lm es un organismo vivo libre "autocontenido". Dentro de las células infectadas del hospedador vacunado, la maquinaria de expresión de procariota de ADU-214 se utiliza exclusivamente para sintetizar la proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina dentro de la bacteria, que posteriormente se secreta al citoplasma de la célula hospedadora para el procesamiento y presentación de antígenos.

Las células hospedadoras pueden combinarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se proporcionan en el presente documento vacunas que comprenden las células hospedadoras divulgadas y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las vacunas pueden administrarse a un sujeto en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada, tal como se divulga en el presente documento.

Método para desencadenar una respuesta inmunitaria

También se divulgan en el presente documento métodos para desencadenar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora,

en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina.

Los métodos divulgados pueden llevarse a cabo usando células hospedadoras que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico divulgadas. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, comprendiendo la molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a actAp-ActAN100*-EGFRvIII-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende un polinucleótido de EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 7.

Cualquiera de las células hospedadoras divulgadas en el presente documento es adecuada para su uso en los métodos divulgados. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una cepa viva-atenuada de L. monocytogenes que está modificada genéticamente para que comprenda una mutación atenuante en actA y/o inlB, y preferentemente una eliminación de la totalidad o

una parte de actA y inlB (citada en el presente documento como “Lm Δ actA/ Δ inlB”), y contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina. En algunas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante de eliminación de actA, un mutante de inserción de actA, un mutante de eliminación de inlB, y un mutante de inserción de inlB, o una de sus combinaciones. Por ejemplo, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante Δ actA/ Δ inlB.

Las células hospedadoras administradas al sujeto pueden comprender una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico está integrada en el genoma de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de actA. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de inlB. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de ARNtArg. Las células hospedadoras administradas al sujeto pueden comprender una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico está dentro de la célula hospedadora de manera extracromosómica.

Los modos adecuados de administración de la célula hospedadora al sujeto incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, por vía oral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, transmucosal, nasal, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la etapa de administración se efectúa por vía intravenosa.

La célula hospedadora puede utilizarse como una plataforma de expresión para expresar las proteínas de fusión divulgadas dentro del sujeto, de este modo desencadenando una respuesta inmunitaria hacia la proteína de fusión heteróloga en un sujeto que contiene la célula hospedadora. Por ejemplo, la proteína de fusión puede expresarse y secretarse por la célula hospedadora en el citosol de una célula infectada dentro del sujeto. Las células infectadas incluyen cualquier célula en el sujeto que puedan captar a la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la célula infectada puede ser una célula presentadora de antígenos. Las células presentadoras de antígeno (CPA) son células del sistema inmunológico usadas para presentar antígenos a las células T. Las CPA incluyen células dendríticas, monocitos, macrófagos, células de Kupffer de la zona marginal, microglía, células de Langerhans,

linfocitos T, y linfocitos B. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede expresarse en una o más células del sujeto.

Cualquiera de las proteínas de fusión divulgadas puede usarse como polipéptidos inmunogénicos para desencadenar una respuesta inmunitaria en el sujeto. En algunas realizaciones, por ejemplo, los métodos pueden comprender la administración al sujeto de una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento inmunogénico de la misma.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender la administración al sujeto de una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender la administración al sujeto de una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende uno o más polipéptidos de EGFRvIII, comprendiendo cada uno de los cuales una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, por ejemplo, el método puede comprender la administración al sujeto de una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende un polipéptido de EGFRvIIIx5 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende

una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina³⁵⁻⁶²² tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

Los métodos divulgados pueden usarse para desencadenar una respuesta inmunitaria para mesotelina, una respuesta inmunitaria para EGFRvIII, inmunidad contra Listeria, o cualquier combinación de los mismos. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos para desencadenar una respuesta inmunitaria para mesotelina en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina. También se proporcionan métodos para desencadenar una respuesta inmunitaria de EGFRvIII en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina. Además, se proporcionan métodos para desencadenar inmunidad contra Listeria en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende Listeria monocytogenes, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina.

Los métodos divulgados pueden desencadenar una respuesta humoral, una respuesta de células T (CD4+ y/o CD8+) específica de antígeno, o ambas. Por ejemplo, tras la entrada de ADU-214 en el citosol de una célula hospedadora eucariota infectada, puede expresarse la proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina y secretarse por la célula hospedadora y posteriormente procesarse por la maquinaria proteasómica de la célula infectada. Los fragmentos de proteína de la proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina pueden presentarse en el contexto de moléculas del CMH de clase II y clase II en la superficie de CPA, lo que puede dar como resultado la inducción de inmunidad sistémica de células T CD4+ y CD8+ específica de EGFRvIII y de mesotelina. Además, tras la administración IV, se cree que las células diana primarias para ADU-214 son células fagocíticas en el hígado y el bazo. La infección de estas células puede dar como resultado la inducción de una cascada de citocinas proinflamatorias iniciada por la producción temprana de interferones de tipo I. Cabe destacar que, ADU-214 escapa del fagolisosoma al citosol de las células

hospedadoras infectadas en donde ADU-214 expresa y secreta los antígenos de EGFRvIII-mesotelina codificados (además de otros productos bacterianos). Como consecuencia del ambiente inmunoestimulador y de la expresión de los antígenos de EGFRvIII-mesotelina por la célula hospedadora, ADU-214 permite

5 posteriormente el cebado de la inmunidad sistémica de células T específicas de EGFRvIII-mesotelina.

Método para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina

En el presente documento se divulgan métodos para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina que comprenden expresar en una

10 célula hospedadora una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de EGFRvIII y un polinucleótido de mesotelina que codifica al polipéptido de mesotelina.

Los métodos divulgados pueden llevarse a cabo en cualquier célula hospedadora que soporte, o que pueda configurarse para que soporte, la

15 transcripción de las moléculas de ácido nucleico divulgadas y la expresión del polipéptido de mesotelina incluyendo, pero sin limitación, células bacterianas, células víricas, células de levadura, células de insecto, y células de mamífero. La etapa de expresión puede llevarse a cabo mediante la introducción de la molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora y permitiendo que la

20 maquinaria de la célula hospedadora produzca el polipéptido de mesotelina. Como alternativa, la etapa de expresión puede llevarse a cabo administrando la célula hospedadora a una célula de interés, en donde el polipéptido de mesotelina se produce dentro de dicha célula de interés. En algunas realizaciones, la etapa de expresión puede llevarse a cabo infectando a una

25 célula de interés con la célula hospedadora, en donde el polipéptido de mesotelina se produce dentro de la célula de interés. En algunas realizaciones, la etapa de expresión puede llevarse a cabo administrando la célula hospedadora a un sujeto, en donde el polipéptido de mesotelina se produce dentro del sujeto.

Por consiguiente, los métodos divulgados pueden usarse para aumentar la expresión de mesotelina en un sujeto. Los métodos pueden comprender expresar en un sujeto una molécula de ácido nucleico que comprende un

30 polinucleótido de EGFRvIII y un polinucleótido de mesotelina que codifica al polipéptido de mesotelina.

El aumento de la expresión de mesotelina en un sujeto puede llevarse a

35

cabo administrando al sujeto una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica al polipéptido de mesotelina. Puede usarse cualquier célula hospedadora divulgada en el presente documento con los métodos divulgados. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una cepa bacteriana viva-atenuada, tal como *L. monocytogenes*. La *L. monocytogenes* puede estar modificada genéticamente para que comprenda una mutación atenuante en actA y/o inlB, y preferentemente una eliminación de la totalidad o una parte de actA y inlB (citada en el presente documento como “*Lm ΔactA/ΔinlB*”), y contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina. En algunas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante de eliminación de actA, un mutante de inserción de actA, un mutante de eliminación de inlB, y un mutante de inserción de inlB, o una de sus combinaciones. Por ejemplo, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante $\Delta actA/\Delta inlB$.

Las células hospedadoras pueden comprender una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico está integrada en el genoma de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de actA. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de inlB. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de ARNtArg. Las células hospedadoras pueden comprender una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico se encuentra en la célula hospedadora de manera extracromosómica.

Las moléculas de ácido nucleico adecuadas para su uso en los métodos divulgados incluyen aquellas moléculas de ácido nucleico divulgadas en otras partes del presente documento. La molécula de ácido nucleico puede comprender una sola copia del polinucleótido de EGFRvIII o una o más copias del polinucleótido de EGFRvIII, en donde el polinucleótido de EGFRvIII comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 4. El número de copias adecuado del polinucleótido de EGFRvIII incluye, pero sin limitación, 2, 3, 4, 5, o más copias. El o los polinucleótidos de EGFRvIII pueden estar flanqueados por una o más secuencias de nucleótido que codifican secuencias

escisoras.

En algunas realizaciones, el método para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina puede comprender expresar en una célula hospedadora una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a actAp-ActAN100*-EGFRvIII-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el método para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina puede comprender expresar en una célula hospedadora una molécula de ácido nucleico que comprende uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el método para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina puede comprender expresar en una célula hospedadora una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el método para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina puede comprender expresar en una célula hospedadora una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 7.

El polinucleótido de mesotelina puede codificar un polipéptido de mesotelina₃₅₋₆₂₂. En algunas realizaciones, el polipéptido de mesotelina puede comprender, consistir en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. Por consiguiente, los métodos divulgados pueden usarse para aumentar el nivel de expresión de mesotelina₃₅₋₆₂₂.

La molécula de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de señal, un promotor, o ambas. En algunas realizaciones, la

molécula de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal comprende una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100* tal como se expone en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender adicionalmente un promotor, en donde el promotor comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica al promotor actA tal como se expone en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de señal y un promotor, en donde la secuencia de señal comprende una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100* tal como se expone en la SEQ ID NO: 3 y el promotor comprende una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica al promotor actA tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.

Métodos para tratar el cáncer en un sujeto

El concepto terapéutico de las vacunas para el cáncer abarca un amplio espectro de tecnologías de plataforma previstas para inducir y potenciar una respuesta inmunitaria adaptativa contra las células tumorales malignas. Se han introducido en ensayos clínicos múltiples tecnologías de vacuna desarrolladas inicialmente en modelos de cáncer no clínicos relevantes en poblaciones de pacientes bien con enfermedad existente o como tratamientos adyuvantes tras la extirpación curativa del tumor. Desafortunadamente, en el NSCLC, la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en todo el mundo, las intervenciones inmunoterapéuticas con vacunas no han logrado aún una prueba de concepto clínica demostrando un beneficio significativo respecto de la respuesta tumoral, el retraso de la recurrencia o progresión tumoral, y en última instancia, la extensión de la supervivencia general (OS). Se cree que esta ausencia de eficacia clínica se debe principalmente a mecanismos de resistencia específicos, que permiten que las células de NSCLC evadan el reconocimiento inmunitario y eviten la destrucción citotóxica por los linfocitos T dirigidos por antígeno que se inducen y activan tras la vacunación terapéutica para el cáncer. Los métodos divulgados abordan estos y otros problemas.

En el presente documento se divulgan métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dichos métodos administrar al sujeto

una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina.

EGFRvIII es una mutación única que solo se encuentra en células
5 tumorales, incluyendo NSCLC, y no en células normales del organismo. Desencadenar una respuesta de células T y anticuerpos específica de EGFRvIII potente y de larga duración puede eliminar a células que expresan EGFRvIII y ejercer presión inmunoselectiva en favor de aquellas células que no expresan EGFRvIII, facilitando potencialmente el tratamiento del tumor residual
10 con los agentes terapéuticos dirigidos existentes. Los métodos divulgados se dirigen específicamente solo a la región neoantigénica de EGFRvIII expresada mediante la eliminación de los exones 2 a 7 de EGFR en células tumorales, EGFR no nativo, que es necesario para la transducción de señales en poblaciones celulares con funcionamiento normal. Por lo tanto, Se espera que
15 las respuestas inmunitarias específicas de EGFRvIII estén restringidas a la población de pacientes que expresan esta variante de EGFR. Además, EGFRvIII puede potenciar la expresión de mesotelina, un antígeno asociado a tumores con expresión limitada en la superficie de tejidos normales, pero altamente expresado por varios tumores humanos, incluyendo NSCLC. Los
20 linfocitos T citotóxicos (CTL) inducidos mediante inmunización con las composiciones divulgadas están diseñados específicamente para reconocer y destruir de manera selectiva tanto células infectadas con la célula hospedadora como células tumorales que sobreexpresan EGFRvIII y mesotelina. Por ejemplo, como consecuencia del ambiente inmunoestimulador y de la
25 expresión de EGFRvIII y mesotelina por la célula hospedadora, una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina, tal como ADU-214, permite posteriormente el cebado de la inmunidad de células T sistémica específica de EGFRvIII y de mesotelina, limitando de este modo el crecimiento de tumores que expresan el antígeno localmente. Por consiguiente, los cánceres adecuados que pueden
30 tratarse con los métodos divulgados incluyen cánceres que expresan mesotelina, cánceres que expresan EGFRvIII, o ambos. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer que expresa mesotelina. En algunos aspectos, por ejemplo, el cáncer puede tener un alto nivel de expresión de mesotelina. Tal como se usa en el presente documento, un "alto nivel de
35 expresión de mesotelina" se refiere a una sobreexpresión de la proteína de

mesotelina en el tejido canceroso en comparación con el nivel de expresión de mesotelina en tejido no canceroso. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer que expresa EGFRvIII. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer que expresa mesotelina y un cáncer que expresa EGFRvIII.

Preferentemente, el cáncer que expresa mesotelina, el cáncer que expresa EGFRvIII, o el cáncer que expresa mesotelina y el cáncer que expresa EGFRvIII es cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón incluye tanto cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) como cáncer de pulmón microcítico. En un aspecto preferido, los métodos divulgados pueden efectuarse en sujetos que tienen NSCLC. El NSCLC incluye adenocarcinoma NSCLC, carcinoma de células escamosas NSCLC, carcinoma de células grandes, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser adenocarcinoma NSCLC. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser carcinoma de células escamosas NSCLC. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser carcinoma de células grandes. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser cualquier combinación de adenocarcinoma NSCLC, carcinoma de células escamosas NSCLC, y carcinoma de células grandes.

Los métodos divulgados pueden usarse para tratar a sujetos que tienen adenocarcinoma NSCLC avanzado (estadio IIIb) o metastásico (estadio IV) y que han fracasado en la terapia convencional y/o que está en progresión. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón puede ser adenocarcinoma NSCLC avanzado. En otras realizaciones, el cáncer de pulmón puede ser adenocarcinoma NSCLC metastásico. La terapia convencional para el NSCLC incluye, pero no se limita a, cirugía, radiación, quimioterapia, o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, en algunos aspectos, los métodos divulgados pueden usarse para tratar a un sujeto que se ha sometido a cirugía. En otros aspectos, los métodos divulgados pueden usarse para tratar a un sujeto que se ha sometido a radiación. En otros aspectos, los métodos divulgados pueden usarse para tratar a un sujeto que se ha sometido a quimioterapia. En otros aspectos más, los métodos divulgados pueden usarse para tratar a un sujeto que se ha sometido a una combinación previa de cirugía, radiación, y quimioterapia.

Cualquiera de las células hospedadoras divulgadas en el presente documento es adecuada para su uso en los métodos divulgados. Por ejemplo,

la célula hospedadora puede ser *Listeria monocytogenes*. En un aspecto preferido, la célula hospedadora puede ser una cepa viva-atenuada de *Listeria monocytogenes* que está modificada genéticamente para que comprenda una mutación atenuante en *actA* y/o *inlB*, y preferentemente una eliminación de la totalidad o una parte de *actA* y *inlB* (citada en el presente documento como “*Lm* $\Delta actA/\Delta inlB$ ”), y contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina. En algunas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante de eliminación de *actA* ($\Delta actA$), un mutante de inserción de *actA*, un mutante de eliminación de *inlB* ($\Delta inlB$), y un mutante de inserción de *inlB*, o una de sus combinaciones. Por ejemplo, la *Listeria monocytogenes* puede ser un mutante $\Delta actA/\Delta inlB$.

Las células hospedadoras administradas al sujeto pueden comprender una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico está integrada en el genoma de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el locus de *ARNtArg*. Las células hospedadoras administradas al sujeto pueden comprender una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina en donde la molécula de ácido nucleico está dentro de la célula hospedadora de manera extracromosómica.

La célula hospedadora puede utilizarse como una plataforma de expresión para expresar las proteínas de fusión de EGFRvIII-mesotelina dentro del sujeto, de este modo desencadenando una respuesta antitumoral para células tumorales que expresan EGFRvIII, células tumorales que expresan mesotelina, o células tumorales que expresan tanto EGFRvIII como mesotelina. La proteína de fusión puede expresarse y secretarse por la célula hospedadora en el citosol de una célula infectada dentro del sujeto. Las células infectadas incluyen cualquier célula en el sujeto que puedan captar a la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la célula infectada puede ser una célula presentadora de antígenos.

Cualquiera de las proteínas de fusión divulgadas puede usarse como polipéptidos inmunogénicos para desencadenar una respuesta antitumoral en el sujeto. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender uno o más polipéptidos de EGFRvIII. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido de EGFRvIII. En otras realizaciones, la

proteína de fusión puede comprender una pluralidad de polipéptidos de EGFRvIII. El número de copias adecuado del polipéptido de EGFRvIII incluye, pero sin limitación, 2, 3, 4, 5, o más copias. En algunas realizaciones, por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 2, 3, 4, 5, o más copias del polipéptido de EGFRvIII. La proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina puede comprender uno o más polipéptidos de EGFRvIII que tienen una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 9.

Los polipéptidos de mesotelina adecuados incluyen polipéptidos de mesotelina que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a los aminoácidos 35-622 de mesotelina. Por ejemplo, la proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina puede comprender un polipéptido de mesotelina que tiene una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, la proteína de fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8. En otros aspectos, la proteína de fusión puede consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8. En otros aspectos más, la proteína de fusión puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar

al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende, consiste en, o consiste esencialmente en uno o más polipéptidos de EGFRvIII comprendiendo cada uno de los cuales una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende, consiste en, o consiste esencialmente en un polipéptido de EGFRvIIIx5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

Las proteínas de fusión divulgadas pueden comprender además una secuencia de señal. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 8 o un fragmento inmunogénico de la misma.

Las moléculas de ácido nucleico adecuadas para su uso en los métodos incluyen cualquiera de aquellas divulgadas en el presente documento. Una molécula de ácido nucleico ejemplar es un polinucleótido de EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede comprender

una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede consistir en una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede consistir esencialmente en una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en uno o más polinucleótidos de EGFRvIII que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

Las moléculas de ácido nucleico adecuadas pueden comprender adicionalmente secuencias de nucleótido que codifican un promotor, una secuencia de señal, o ambas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a actAp-ActAN100*-EGFRvIII-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede consistir en una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones más, la molécula de ácido nucleico puede consistir esencialmente en una secuencia de nucleótido que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a

la SEQ ID NO: 1.

Los métodos divulgados pueden comprender adicionalmente medir los niveles de mesotelina, detectar a EGFRvIII, o ambos en una muestra biológica del sujeto antes de administrar la composición. Los métodos para medir los
5 niveles de mesotelina y/o detectar la presencia de EGFRvIII en una muestra biológica del sujeto incluyen, pero sin limitación, inmunohistoquímica (IHC), transferencia de Western, microscopía, inmunoprecipitación, ensayos BCA, espectrofotometría, o cualquier combinación de los mismos. Los niveles de mesotelina y/o de EGFRvIII pueden detectarse en muestras biológicas
10 incluyendo, pero sin limitación, sangre, fluido linfático, médula ósea, una muestra de tumor sólido, o cualquier combinación de las mismas.

Las composiciones pueden comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden combinarse con cualquier tampón adecuado, incluyendo, pero sin limitación,
15 suero salino tamponado con fosfato (PBS), y glicerol. En una realización ejemplar, las composiciones pueden formularse además en suero salino tamponado con fosfato (PBS) de Dulbecco y glicerol, almacenarse congeladas (a o por debajo de -60°C) hasta su administración, y administrarse mediante infusión intravenosa (IV) en cloruro de sodio durante un periodo de tiempo
20 adecuado. Un experto en la materia sabrá que el periodo de tiempo para la administración de la composición depende, en parte, del tipo de cáncer, de la gravedad del cáncer, y de la edad del sujeto, el peso, etc. Preferentemente, la composición puede administrarse durante un periodo de horas. Por ejemplo, la composición puede administrarse durante un periodo de 1-2 horas. En otras
25 realizaciones, la composición puede administrarse en menos de 1-2 horas. En otras realizaciones más, la composición puede administrarse en más de 1-2 horas.

El tratamiento puede incluir una sola dosis de la composición o múltiples dosis de la composición. Por lo tanto, los métodos divulgados pueden
30 comprender la administración al sujeto de una o más dosis de una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina. Los factores que pueden determinar el número de dosis incluyen, por ejemplo, la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del
35 cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o

cualquier combinación de las mismas. Sin pretender ser limitantes, el número de dosis puede aumentarse basándose en la progresión o fracaso en la reducción de la progresión del cáncer, aumento de la gravedad o ausencia de cambios en la gravedad de los síntomas del cáncer, frecuencia aumentada o

5 ausencia de cambio en la frecuencia de los síntomas del cáncer, aumento de tamaño o ausencia de cambio en el tamaño del tumor, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, puede administrarse al sujeto de 1 a 100 dosis o más de la composición.

Los factores que pueden determinar la dosis de la célula hospedadora incluyen, por ejemplo, la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del

10 cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición puede comprender de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) de una

15 célula hospedadora. En algunos aspectos, la composición comprende aproximadamente 1×10^8 UFC de una célula hospedadora. En algunos aspectos, la composición comprende aproximadamente 1×10^9 UFC de una célula hospedadora.

La composición puede administrarse aproximadamente una vez cada 7

20 días, aproximadamente una vez cada aproximadamente 14 días, aproximadamente una vez cada 21 días, aproximadamente una vez cada 28 días, aproximadamente una vez cada 35 días, aproximadamente una vez cada 42 días, aproximadamente una vez cada 49 días, aproximadamente una vez cada 56 días, aproximadamente una vez cada 63 días, aproximadamente una

25 vez cada 70 días, aproximadamente una vez cada 77 días, aproximadamente una vez cada 84 días, o aproximadamente una vez cada 91 días.

Basándose en lo anterior, los expertos en la materia entenderán que podría tratarse a un sujeto para la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del

30 tumor, o cualquier combinación de los mismos administrando una dosis descrita de una cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, en donde la dosificación se repite a intervalos regulares, tal como se ha descrito. Por consiguiente, en una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 a

35 aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la

gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 7 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

5 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier

10 combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 14 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1

15 $\times 10^8$ a aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 21 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

20 farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier

25 combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 35 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1

30 $\times 10^8$ a aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 45 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

35 farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 60 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

5 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 90 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

10 farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 7 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

15 farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 14 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

20 farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 21 días. Adicionalmente, las composiciones

25 descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

30 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 21 días. Adicionalmente, las composiciones

35 descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

- farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer,
- 5 el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 35 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una
- 10 dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 45 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación
- 15 farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer,
- 20 el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 60 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una
- 25 dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 90 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación
- 30 farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer,
- 35 el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 7 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación

farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 14 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

5 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 21 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

10 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 35 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

15 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 45 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

20 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 60 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

25 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 60 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

30 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 60 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

35 En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 60 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo. En una realización, puede administrarse una composición a un sujeto a una dosis de aproximadamente 1×10^9 UFC para tratar la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, en donde la dosificación se repite una vez cada 90 días. Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse en una preparación farmacéutica adecuada para dicha dosis que se va a administrar de este modo.

Preferentemente, el tratamiento puede incluir un periodo de tiempo entre dosis en donde la composición no se administra al sujeto. Por ejemplo, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una primera dosis de una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina, controlar la eficacia de la primera dosis, y, en caso de que la primera dosis no sea eficaz, administrar al sujeto una o más dosis de la composición. Los factores que pueden determinar la eficacia de la composición incluyen, por ejemplo, la progresión del cáncer, la gravedad de los síntomas del cáncer, la frecuencia de los síntomas del cáncer, el tamaño del tumor, o cualquier combinación de las mismas. Sin pretender ser limitantes, la progresión o el fracaso para reducir la progresión del cáncer, aumento de la gravedad o ausencia de cambios en la gravedad de los síntomas del cáncer, frecuencia aumentada o ausencia de cambio en la frecuencia de los síntomas del cáncer, aumento de tamaño o ausencia de cambio en el tamaño del tumor, o cualquier combinación de los mismos, pueden ser indicaciones de que la primera dosis de la composición no es eficaz. Los periodos de tiempo adecuados entre dosis incluyen días, semanas, o meses. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo entre dosis puede ser de aproximadamente 1 día a aproximadamente 90 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 80 días, de aproximadamente 10 días a aproximadamente 70 días, de aproximadamente 15 días a aproximadamente 60 días, de aproximadamente 20 días a aproximadamente 50 días, o de aproximadamente 25 días a aproximadamente 40 días. Por ejemplo, el periodo entre dosis puede ser de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 14 días,

aproximadamente 21 días, aproximadamente 28 días, aproximadamente 35 días, aproximadamente 42 días, aproximadamente 49 días, aproximadamente 56 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 65 días, aproximadamente 70 días, aproximadamente 80 días, aproximadamente 85 días, o aproximadamente 90 días.

Los modos adecuados de administración de la composición al sujeto incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, oral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, transmucosal, nasal o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la etapa de administración puede llevarse a cabo por vía intravenosa.

El tratamiento puede comprender además administrar un antibiótico al sujeto después de administrar la composición. Por ejemplo, una vez que se ha administrado la dosis final de la composición al paciente, y después de un intervalo de tiempo adecuado, puede administrarse un antibiótico al paciente.

Por lo tanto, en un aspecto preferido, el antibiótico se administra después de una última dosis de la composición. Los antibióticos adecuados incluyen, pero sin limitación, amoxicilina o trimetoprima/sulfametoxazol en sujetos que son alérgicos a la penicilina. Un experto en la materia será capaz de determinar una dosificación suficiente y una pauta de dosificación para administrar el antibiótico al sujeto.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir adicionalmente algunas de las realizaciones divulgadas en el presente documento. Los ejemplos están previstos para ilustrar, no para limitar, las realizaciones divulgadas.

EJEMPLOS

Métodos

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas usadas en los estudios divulgados se listan en la tabla 2.

Tabla 2

Cepa	Alias	Casete de antígeno
Lm11	Lm Δ actA Δ inlB	ninguno
CRS-207	hMeso38	Mesotelina ₃₅₋₆₂₂
ADU-214	PL1304	EGFRvIIIx5-Mesotelina ₃₅₋₆₂₂

Construcción molecular de ADU-214

Se clonaron el promotor actA de 221 pares de bases (pb) y la secuencia de señal ActAN100* de 258 pb en un derivado del vector de integración pPL2 en forma de un fragmento KpnI-BamHI. Se clonó una secuencia de 486 pb que codificada 5 copias de la región de unión a neoantígeno de EGFRvIII (EGFRvIIIx5) en fase con ActAN100* en forma de un fragmento BamHI-MfeI. Se clonó una secuencia de 1767 pb que codificaba los aminoácidos 35-622 de mesotelina humana (mesotelina₃₅₋₆₂₂) en fase en forma de un fragmento MfeI-EagI. El casete de expresión completo se insertó en el locus ARNtArg de la cepa de plataforma LADD (Lm11, también citada como Lm Δ actA Δ inlB) tal como se describe en Lauer, P. et al., Construction, Characterization and Use of Two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. J. Bacteriology (2002) 184(15): 4177-4186), incorporado en el presente documento por referencia, y se eliminaron las secuencias estructurales del vector.

Se ilustra un esquema de ADU-214 y CRS-207 en la FIG 1A y la FIG. 1B, respectivamente.

Transferencias de Western de células cultivadas en caldo de cultivo e infecciones intracelulares

Para las transferencias de Western de cultivos en caldo de cultivo, se cultivaron cepas de *Listeria* en medio de levadura hasta una DO₆₀₀ de 2,0. Las bacterias se retiraron por centrifugación, y los sobrenadantes se precipitaron con TCA sobre hielo. Los sobrenadantes se centrifugaron, los sedimentos se lavaron con acetona y se resuspendieron en tampón LDS reductor (Invitrogen). Las muestras se calentaron a 95°C durante 10 minutos, y se ejecutaron cantidades equivalentes en geles de poliacrilamida al 4-12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para análisis por transferencia de Western. Las transferencias se sondaron con un anticuerpo policlonal producido contra el extremo N-terminal maduro de la proteína ActA. La detección se visualizó y

cuantificó con el sistema de detección IR Licor Odyssey.

Para las transferencias de Western intracelulares, se inocularon células DC2.4 con cada cepa de Lm a una multiplicidad de infección (MDI) de 10 durante 1 hora, y las células se lavaron 3 veces con PBS y medio DMEM suplementado con 50 µg/ml de gentamicina. Las células se recogieron 7 horas después de la infección. Las células se lisaron con tampón de muestra SDS, se recogieron y se ejecutaron en geles de poliacrilamida al 4-12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para análisis por transferencia de Western. Las transferencias de Western intracelulares utilizaron un anticuerpo policlonal producido contra el extremo N-terminal de la proteína ActA y se normalizaron a la expresión de p60 (una proteína de Lm no relacionada) con un anticuerpo monoclonal anti-p60. La detección de antígeno se visualizó y cuantificó con el sistema de detección IR Licor Odyssey.

Respuestas inmunitarias específicas de antígeno en ratones vacunados

Para la inmunogenicidad específica de mesotelina, se vacunó a ratones Balb/c (n=5) con 2×10^6 ufc de ADU-214 por vía intravenosa (IV). Después de siete días, se recogieron los bazos y se midieron las respuestas inmunitarias mediante el ensayo ELIsport de IFN γ usando una biblioteca de péptidos solapantes para mesotelina (153 péptidos 15meros solapantes en 11 aminoácidos) o medio de control no estimulado. Para la inmunogenicidad específica de EGFRvIII, se vacunó a ratones C3H/HeN (n=4) con 5×10^6 ufc de ADU-214 por vía IV. Después de siete días, se recogieron los bazos y se midieron las respuestas inmunitarias mediante un ensayo ELIsport para IFN γ usando EGFRvIII₂₆₋₃₃ – el péptido de unión K^k EEKKGNYV.

Inmunidad protectora frente a una exposición a Listeria de tipo silvestre

Se vacunó a ratones Balb/c una vez con 2×10^6 ufc de cada cepa de Lm por vía IV. Cuarenta días después, se expuso a los ratones por vía IV con 5×10^4 ufc (2 veces la dosis DL50) de la cepa de Lm de tipo silvestre (TS) DP-L4056 (descrita en Lauer, P. et al., Construction, Characterization and Use of Two Listeria monocytogenes site-specific phage integration vectors. J. Bacteriology (2002) 184(15): 4177-4186), incorporado en el presente documento por referencia). Tres días después, se recogieron y homogenizaron los bazos. Las diluciones se plantaron en placas BHI que contenían 200 µg/ml de estreptomina para determinar las ufc/órgano. El límite de detección (LDD) en este ensayo es de 50 UFC.

Estudios en tumores

Se transfectaron células tumorales CT26 con un plásmido de ADN que expresa mesotelina humana para producir el clon 3 de la línea celular estable CT26-hMeso. Inmediatamente antes de la implantación, se descongeló una

5 alícuota de células tumorales congeladas y se cultivaron hasta confluencia en medio para células T. Cuando alcanzaron la confluencia, se recogieron las células y se resuspendieron en HBSS hasta una concentración de 1×10^6 células/ml para la implantación de 2×10^5 células/200 μ l dosis/ratón. En el día 0, se implantó a ratones Balb/c (10 ratones por grupo) por vía intravenosa (IV) con

10 2×10^5 células CT26-hMeso. En el día 3 después del implante del tumor, se administró por vía IV a los ratones: HBSS; 5×10^6 ufc, 1×10^5 ufc, o 5×10^3 ufc de ADU-214; o 5×10^6 ufc de Lm11 (cepa de plataforma vacía). Se controló la supervivencia de los ratones.

Tratamiento del cáncer

15 Se lleva a cabo un estudio primero en humanos (FiH) de fase 1 sin enmascaramiento multicéntrico en 2 partes para evaluar la seguridad, establecer la dosis de fase 2 recomendada (RP2D), y determinar la eficacia clínica preliminar y la respuesta inmunológica de un solo agente, ADU-214, en

20 sujetos con NSCLC (adenocarcinoma) avanzado (estadio IIIb) o metastásico (estadio IV) que hayan fracasado con la terapia convencional y que estén en progresión en la exploración. El tratamiento se administra hasta que se confirma la progresión de la enfermedad mediante radiografía, toxicidad inaceptable, retirada del consentimiento, el investigador decide detener el

tratamiento, el comienzo de la terapia anticáncer posterior, o el patrocinador da

25 por finalizado el estudio.

Parte 1 (escalado de la dosis): se diseña para determinar la RP2D basándose en las evaluaciones de seguridad y farmacodinámicas. Se administran secuencialmente dos dosis de ADU-214 (Cohorte de dosis 1-A: 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) y Cohorte de dosis 1-B: 1×10^9

30 UFC), aplicando un diseño de intervalo de probabilidad de toxicidad modificado (mTPI). Después de que el último sujeto en cada cohorte de dosis haya completado el tratamiento en el periodo de observación DLT, el Equipo de Evaluación del Estudio (SET) evalúa todos los datos de seguridad y toma una decisión respecto a escalar, permanecer en la dosis actual, o desescalar la

35 cohorte de dosis con el segundo grupo de sujetos tratados.

Parte 2 (Expansión de la dosis): La parte 2 está diseñada para evaluar dos cohortes de expansión tras determinar la RP2D para ADU-214. Se reclutan aproximadamente 30 sujetos (cohorte 2-A [n=20] y cohorte 2B [n=10]) y se tratan con la RP2D en la parte 2. Hay disponible material tumoral archivado para una evaluación inmunohistoquímica centralizada de mesotelina para todos los sujetos en la parte 2. Solo los sujetos con tumores que sobreexpresan mesotelina y que tienen tumores primarios o lesiones metastásicas susceptibles de ser biopsiadas se reclutan para la cohorte 2B. Los sujetos en la cohorte 2B consienten someterse a biopsias antes y después del tratamiento. Aunque es opcional para las cohortes 1A y 1B, y la cohorte 2A, las biopsias antes y después del tratamiento de las lesiones metastásicas son muy deseables para entender adicionalmente la actividad molecular del fármaco del estudio. El procedimiento de biopsia se lleva a cabo usando obtención de imágenes por TC o PET TC.

ADU-214 se administra por vía intravenosa una vez cada 21 días durante el periodo de tratamiento sin enmascaramiento. ADU-214 se administra por vía intravenosa durante un periodo de 1 hora con la opción de aumentar la duración de la infusión, si fuera necesario. El tratamiento se administra hasta que se confirma la progresión de la enfermedad mediante radiografía, toxicidad inaceptable, retirada del consentimiento, el investigador decide detener el tratamiento, el comienzo de la terapia anticáncer posterior, o el patrocinador da por finalizado el estudio. Se evalúan la eficacia y la seguridad.

Población de estudio - Sujetos de ≥ 18 años de edad con adenocarcinoma NSCLC documentado histológica o citológicamente; Enfermedad en estadio IIIb o IV; progresión tumoral documentada basándose en obtención de imágenes por tomografía computarizada (TC); al menos 1 sitio de enfermedad medible (solo parte 2) y puntuación de estado de rendimiento del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 0 o 1 son reclutados en este estudio para la parte 1 y la parte 2 combinadas. El sujeto tiene que haber recibido al menos 2 líneas anteriores de tratamiento sistémico aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, de los cuales una terapia tiene que ser un régimen que contiene platino (excepción: sujetos que rechazaron un régimen de segunda línea después de quimioterapia de primera línea que contiene platino).

Evaluaciones de eficacia - Las evaluaciones de eficacia se evalúan por

el investigador de acuerdo con los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (V1.1; Eur. J. Cancer 45: 228, 2009) y Criterios de Respuesta Inmunitaria Relacionada (Clin. Cancer Res. 15:7412, 2009). La respuesta de la enfermedad se evalúa usando escáneres TC con contraste IV del cuello, pecho, abdomen, y pelvis. Los sujetos que son intolerantes a los agentes de contraste de TC IV se someten a escáneres TC con contraste oral. Puede usarse obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) para evaluar los sitios de enfermedad de los que no se puedan obtener imágenes adecuadamente usando TC. La IRM cerebral solo es necesaria en caso de que esté indicada clínicamente. Todas las evaluaciones de eficacia, incluyendo otros sitios de enfermedad mediante obtención de imágenes radiológicas, examen físico, u otros procedimientos según sea necesario, se efectúan en el sitio. Las evaluaciones se llevan a cabo a lo largo del estudio en cada instante usando el mismo método de evaluación usado para evaluar la enfermedad inicialmente. Los datos también se recogen en las terapias anticancerosas posteriores y la supervivencia general en el periodo de seguimiento después del tratamiento.

Resultados

Expresión de ADU-214 en caldo de cultivo

Tal como se ilustra en la FIG. 2, la fusión de EGFRvIII a mesotelina³⁵⁻⁶²² dio como resultado un aumento de aproximadamente 50 veces más proteína que CRS-207 en caldo de cultivo. Se predice que la proteína de fusión ADU-214 es de aproximadamente 88 kDa (marcada como EGFRvIII-Meso). Se predice que la proteína de CRS-207 es de aproximadamente 72 kDa (marcada como Meso). No se detectó banda para Lm11, la cepa de plataforma de control negativo.

Expresión de ADU-214 en células infectadas

Tal como se ilustra en la FIG. 2, la fusión de EGFRvIII a mesotelina³⁵⁻⁶²² dio como resultado un aumento de aproximadamente 42 veces más expresión intracelular de la proteína que CRS-207. Se predice que la proteína de fusión ADU-214 es de aproximadamente 88 kDa. Se predice que la proteína CRS-207 es de aproximadamente 72 kDa. p60 es una proteína de Lm constitutiva que se correlaciona con números bacterianos en células infectadas y es de aproximadamente 60 kDa. El panel superior muestra la expresión de la proteína de fusión detectada con el anticuerpo policlonal ActA. El panel inferior

muestra la expresión de p60 detectada con anticuerpo monoclonal. No se detectó banda para Lm11, la cepa de plataforma de control negativo.

Respuestas inmunitarias de células T específicas de antígeno en ratones vacunados

5 ADU-214 indujo robustas respuestas inmunitarias mediadas por células T específicas de mesotelina en ratones Balb/c (FIG 4A). ADU-214 indujo robustas respuestas inmunitarias de células T CD8+ específicas de EGFRvIII en ratones C3H/HeN (FIG. 3A y FIG. 3B).

10 La vacunación con ADU-214 induce inmunidad protectora frente a una exposición a *Listeria* de TS.

Una sola vacunación con ADU-214 indujo inmunidad totalmente protectora, a largo plazo frente a una exposición a *Listeria* de TS, hasta niveles comparables a la cepa de plataforma de vacuna LM11 (FIG. 4). La vacunación con ADU-214 dio como resultado una reducción mayor de 6-log en las ufc después de la exposición a Lm de TS. La inmunidad funcional es una combinación de la magnitud de la respuesta inmunitaria específica de antígeno y de la capacidad de la respuesta inmunitaria para proteger frente a una exposición futura. En este caso, la funcionalidad se evaluó con una exposición a *Listeria* de tipo silvestre totalmente virulenta.

20 La vacunación terapéutica con ADU-214 da como resultado una respuesta antitumoral dependiente de la dosis.

En un modelo terapéutico de metástasis de pulmón de CT26-hMeso, se determinó la eficacia antitumoral de ADU-214 en ratones BALB/c (FIG. 5). Los ratones fueron vacunados por vía IV con diferentes dosis de ADU-214, la cepa de plataforma de *Lm* $\Delta actA \Delta inlB$ (ANZ-100) o con solución salina equilibrada de Hank (HBSS). De manera coherente con la potente inmunogenicidad de la vacuna, los animales que recibieron ADU-214 tuvieron una supervivencia mejorada en comparación con los animales que recibieron ANZ-100 (citado como Lm11) o HBSS. La supervivencia prolongada después de la administración de ADU-214 fue dependiente de la dosis, con un 70% de supervivientes a largo plazo en el grupo que recibió la dosis más alta (5×10^6 UFC), del 60% en la dosis intermedia (1×10^5 UFC), y del 20% en la dosis más baja (5×10^3 UFC).

35 Los expertos en la materia apreciarán que pueden efectuarse numerosos cambios en las realizaciones preferidas divulgadas en el presente

documento y que dichos cambios y modificaciones pueden efectuarse sin apartarse del espíritu de la invención. Por lo tanto, se prevé que las reivindicaciones adjuntas abarquen todas estas variaciones equivalentes que se encuentren dentro del auténtico espíritu y alcance de las composiciones y métodos divulgados.

5

Las divulgaciones de cada patente, solicitud de patente, y publicación citada o descrita en este documento se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Secuencia de nucleótido de actAp-ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ (SEQ ID NO:1)

gggaagcagttggggtaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgatattcttaaaataattcatg
aatatttttcttatattagctaattaagaagataattaactgctaataccttaacggaataaattagtgaaaatgaag
gccgaattttcctgttctaaaaagggtgtattagcgtatcacgaggaggaggtataaGTGGGATTAAATAGA
TTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTTCATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACC
CCGACATAATATTTGCAGCGACAGATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATG
AATGGGAAGAAGAATACGAACTGCACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGG
AACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAAAAATACGAACAAAGCAGACCAAGATAATA
AACGTAAAGCAAAGCAGAGAAAGGT~~ggatcc~~GCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAG
TCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTACGTGGTGACGGATCATGGATCGT
GTGCCGATGGCTCAGTAAAGACTAGTGCGAGCAAAGTGGCCCCTGCATCACGA
GCACTTGAAGAGAAAAAAGGAACTATGTTGTGACCGATCATGGTAGCTGCGG
AGATGGTTCAATTAAATTATCAAAAGTCTTACCAGCATCTAGAGCTTTAGAGGAA
AAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCATGGAAGTTGTGCTGACGGAAGTGTT
AAAGCGTCGAAAGTAGCTCCAGCTTCTCGCGCATTAGAAGAAAAGAAAGGCAA
TTATGTTGTAACAGACCATGGTAGTTGTGGTGATGGCTCGATCAAATTGTCAAA
AGTTCTACCGGCTTCTCGTGCGCTAGAAGAGAAGAAAGGAAATTACGTAGTTAC
AGACCACGGCTCTTGCGCGGATGGTTCCGTTAAAC~~caattg~~CGTACATTAGCAGGT
GAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCACTTGACGGTGTATTAACGAATCCACCAA
ATATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAATTATTAGGTTTTCCATGTGCAGAAGTTT
CAGGTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGCACAAAA
AAACGTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCG
AACCACCAGAAGACTTAGATGCACTTCCTTTAGACCTTCTTTTATTCTTAAATC
CAGATGCATTTTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTCGAATTACA
AAAGCCAATGTTGATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTATT
ACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCC

GATGTTTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTGGTCGTTTCGTTGCA
 GAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCCAGGACCTTTAGA
 TCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCACC
 ATATGGCCCACCAAGTACATGGAGTGTTTCTACAATGGATGCGTTAAGAGGTT
 TATTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTA
 GCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGCGACAACCAGAAC
 GTACAATTCTACGTCCAAGATTTTCGTAGAGAAGTAGAAAAACGGCGTGTCTT
 AGTGGCAAAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTTTAATTTTTTATAAAAAATG
 GGAATTAGAAGCATGTGTGCGATGCAGCATTACTAGCTACACAAATGGATCGT
 GTTAATGCTATTCCATTACATATGAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAAATTA
 GACGAATTATATCCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTA
 CTTATTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAATGGAATGTTACAAGTT
 TAGAAACATTAAAAGCGCTTTTAGAAGTTAACAAAGGTCATGAAATGAGTCCA
 CAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTCGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAA
 AGATACTTTAGATACATTAACAGCATTTTATCCTGGCTACTTATGCAGTTTATC
 ACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCTGGGCAGTTCGTCCG
 CAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAATTAGATGTTTTATATCCAAAAGC
 AAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTGAATATTTTCGTAAAAATTCAAT
 CCTTTTTAGGTGGTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAAGCCAACAAAAT
 GTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAGTTCTACC
 ATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACACGTAGAAGGATTAA
 AAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTCGCGATTGGATTTTACGTCAACGTCA
 AGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCGGTATTCCGAATGGAT
 ATTTAGTGTTAGATTTATCGGTTCAAGAAGCATTAAAGTGGTACACCGTGTTTAT
 TAGGTCCAGGTCCAGTTTTAACAGTGTTAGCATTATTATTAGCCAGTACATTAG
 CTtaa

Secuencia de nucleótido del promotor actA (SEQ ID NO: 2)

gggaagcagttgggggtaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgatattcttaaaataattcatg
 aatatttttcttatattagctaattaagaagataattaactgctaataccaatttttaacggaataaattagtgaagaatgaag
 gccgaattttcctgttctaaaaagggtgtattagcgtatcacgaggaggagtataa

Secuencia de nucleótido de ActAN100* (SEQ ID NO: 3)

GTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTCTATTACTGCCAACT
 GCATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAGATAGCGAAGATTCCA
 GTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAATACGAACTGCACGTGAAGTAAGTT
 CACGTGATATTGAGGAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAAAAATACGAACAAAG

CAGACCAAGATAATAAACGTAAAGCAAAGCAGAGAAAGGT
Secuencia de nucleótido de EGFRvIII (SEQ ID NO: 4)
CCdGCwwswmGhGCdyTwGArGArAArAArGGnAAyTAyGTnGTdACvGAyCAyGGhw sbTGy
Secuencia de nucleótido de EGFRvIIIx5 (SEQ ID NO: 5)
GCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTA CGTGGTGACGGATCATGGATCGTGTGCCGATGGCTCAGTAAAGACTAGTGCGA GCAAAGTGGCCCCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAAGGAACTATGTT GTGACCGATCATGGTAGCTGCGGAGATGGTTCAATTAAATTATCAAAAGTCTTA CCAGCATCTAGAGCTTTAGAGGAAAAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCAT GGAAGTTGTGCTGACGGAAGTGTTAAAGCGTCGAAAGTAGCTCCAGCTTCTCG CGCATTAGAAGAAAAGAAAGGCAATTATGTTGTAACAGACCATGGTAGTTGTGG TGATGGCTCGATCAAATTGTCAAAGTTCTACCGGCTTCTCGTGCGCTAGAAGA GAAGAAAGGAAATTACGTAGTTACAGACCACGGCTCTTGCGCGGATGGTTCCG TTAA
Secuencia de nucleótido de Mesotelina ₃₅₋₆₂₂ (SEQ ID NO: 6)
CGTACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCAGTTGACGGTGTAT TAACGAATCCACCAAATATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAATTATTAGGTTTTT CATGTGCAGAAGTTTCAGGTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTT GCATTAGCACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTAGC CCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCACTTCCTTTAGACCTTC TTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTT TTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTGATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAA AGACAACGTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTGCGGGTAGCTT ATTAAGTGAAGCCGATGTTCTGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTG GTCGTTTTCGTTGCAGAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGC CCAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAG GAGGAGGCCACCATATGGCCCACCAAGTACATGGAGTGTCTTCTACAATGGA TGCGTTAAGAGGTTTATTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCC ACAAGGCATTGTAGCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGG CGACAACCAGAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTTCTAGAGAAGTAGAAA AAACGGCGTGTCCTAGTGGAACAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTTTAAT TTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTGATGCAGCATTACTAGCTA CACAAATGGATCGTGTTAATGCTATTCCATTACATATGAACAATTAGATGTTT TAAAGCATAAATTAGACGAATTATATCCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATT

CAACATTTAGGTTACTTATTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAATG
 GAATGTTACAAGTTTAGAAACATTA AAAAGCGCTTTTAGAAGTTAACAAAGGTC
 ATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTTCGTTAAAGGCCGT
 GGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAACAGCATT TTTATCCTGGCTAC
 TTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCTG
 GGCAGTTTCGTC CGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAATTAGATGTTT
 TATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTGAATATTTT
 GTAAAAATTCAATCCTTTTTAGGTGGTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATT
 AAGCCAACAAAATGTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAG
 ATGCAGTTCTACCATTAAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACAC
 GTAGAAGGATTAAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTTCGCGATTGGATTT
 TACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCCGT
 ATTCCGAATGGATATTTAGTGTTAGATTTATCGGTTCAAGAAGCATTAAAGTGGT
 ACACCGTGTTTATTAGGTCCAGGTCCAGTTTAAACAGTGTTAGCATTATTATTA
 GCCAGTACATTAGCT

Secuencia de nucleótido de EGFRvIIIx5-Mesotelina₃₅₋₆₂₂ (SEQ ID NO: 7)

GCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTA
 CGTGGTGACGGATCATGGATCGTGTGCCGATGGCTCAGTAAAGACTAGTGCGA
 GCAAAGTGGCCCCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAAGGAACTATGTT
 GTGACCGATCATGGTAGCTGCGGAGATGGTTCAATTAAATTATCAAAAGTCTTA
 CCAGCATCTAGAGCTTTAGAGGAAAAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCAT
 GGAAGTTGTGCTGACGGAAGTGTTAAAGCGTCGAAAGTAGCTCCAGCTTCTCG
 CGCATTAGAAGAAAAGAAAGGCAATTATGTTGTAACAGACCATGGTAGTTGTGG
 TGATGGCTCGATCAAATTGTCAAAGTTCTACCGGCTTCTCGTGCGCTAGAAGA
 GAAGAAAGGAAATTACGTAGTTACAGACCACGGCTCTTGCGCGGATGGTTCCG
 TTAAACaattgCGTACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCCTTG
 ACGGTGTATTAACGAATCCACCAAATATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAATTA
 TTAGGTTTTCCATGTGCAGAAGTTTCAGGTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGA
 GTTAGCAGTTGCATTAGCACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTAC
 GTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCACTTCCT
 TTAGACCTTCTTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCAGGACCACAAGCATGT
 ACACGTTTTTTTTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTGATTTATTACCTCGTGGG
 GCTCCTGAAAGACAACGTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCG
 CGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGATGTTTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTG
 ATTTACCTGGTCGTTTCGTTGCAGAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTA

GTTTCATGCCCAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAG
 CTCTTCAAGGAGGAGGCCACCACCATATGGCCCACCAAGTACATGGAGTGTTTC
 TACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTC
 GTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGAT
 CCGTCTTGGCGACAACCAGAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTCGTAGAG
 AAGTAGAAAAAACGGCGTGTCTAGTGGCAAAAAAGCACGTGAAATTGATGA
 AAGTTTAATTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTTCGATGCAGCATT
 ACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCTATTCCATTACATATGAACAATT
 AGATGTTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTATATCCACAAGGTTATCCAGAAT
 CAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATAC
 GCAATGGAATGTTACAAGTTTAGAAACATTAAGCGCTTTTAGAAGTTAAC
 AAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTCGTAA
 AGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAACAGCATTTTATC
 CTGGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGT
 AGTATCTGGGCAGTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAATT
 AGATGTTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTG
 AATATTTTCGTAAAAATTCAATCCTTTTTAGGTGGTGCACCAACTGAAGATCTAA
 AAGCATTAAGCCAACAAAATGTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTA
 CGTACAGATGCAGTTCTACCATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGG
 TCCACACGTAGAAGGATTAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTCGCGAT
 TGGATTTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAA
 GGCGGTATTCCGAATGGATATTTAGTGTTAGATTTATCGGTTCAAGAAGCATT
 AAGTGGTACACCGTGTTTATTAGGTCCAGGTCCAGTTTTAACAGTGTTAGCAT
 TATTATTAGCCAGTACATTAGCT

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión ADU-214 (SEQ ID NO: 8)

MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDI
 EELEKSNKVKNNTNKADQDNKRKAKAEKGGSASKVLPASRALEEKKGNYVVDHGS
 CADGSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVDHGS CGDGSIKLSKVLPASRALEEKK
 GNYVVDHGS CADGSVKASKVAPASRALEEKKGNYVVDHGS CGDGSIKLSKVLP
 ASRALEEKKGNYVVDHGS CADGSVKQLRTLGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLS
 PRQLLGFPCEVSGLSERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLRCLAHRLSEPPEDLDAL
 PLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGV RG
 SLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQG
 GGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLPV LGQPIIRSIPQGIVA AWRQRSSRDPSWRQP
 ERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNA

IPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETALKALL EVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPS SIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKAL SQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQ RQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSVQEALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLASTLA
Secuencia de aminoácidos de EGFRvIII (SEQ ID NO: 9)
PASRALEEKKGNYVVTDHGSC
Secuencia de aminoácidos de EGFRvIIIx5 (SEQ ID NO: 10)
ASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVT DHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVKASKVAPASRALE EKKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVK
Secuencia de aminoácidos de Mesotelina ₃₅₋₆₂₂ (SEQ ID NO: 11)
RTL AGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLSPRQLLGFPCAIEVSGLSTERVRELAVAL AQ KNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRIT KANVDLLPRGAPERQRLLPAAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVA ESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTWSVSTMDALRGL LPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPRTLPRFRREVEKTACPSGKK AREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQG YPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETALKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFV KGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLD VLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRT DAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGI PNGYLVLDLSVQEALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLASTLA
Secuencia de aminoácidos de ActAN100* (SEQ ID NO: 12)
(engarce BamHI gs = subrayado)
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDI EELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEKGGS
Secuencia de nucleótido 1 de EGFRvIII (SEQ ID NO: 13)
CCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTACGTGGTGACGGATCA TGGATCGTGT
Secuencia de nucleótido 2 de EGFRvIII (SEQ ID NO: 14)
CCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAGGAACTATGTTGTGACCGATCAT GGTAGCTGC

Secuencia de nucleótido 3 de EGFRvIII (SEQ ID NO: 15)
CCAGCATCTAGAGCTTTAGAGGAAAAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCAT GGAAGTTGT
Secuencia de nucleótido 4 de EGFRvIII (SEQ ID NO: 16)
CCAGCTTCTCGCGCATTAGAAGAAAAGAAAGGCAATTATGTTGTAACAGACCAT GGTAGTTGT
Secuencia de nucleótido 5 de EGFRvIII (SEQ ID NO: 17)
CCGGCTTCTCGTGCGCTAGAAGAGAAGAAAGGAAATTACGTAGTTACAGACCA CGGCTCTTGC
Secuencia de nucleótido del promotor hly (SEQ ID NO: 18)
tcctttgattagtatattcctatcttaaagttacttttatgtggaggcattaacatttgtaatgacgtcaaaaggatagcaag actagaataaagctataaagcaagcatataatattgcgtttcatctttagaagcgaatttcgccaatattataattatcaa aagagaggggtggcaaacggtatttggcattattaggttaaaaaatgtagaaggagagtgaaaccc
Secuencia de nucleótido de LLO441 (SEQ ID NO: 19)
ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGC GCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCA TCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAA GAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAAA CAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAG GTTACAAAGATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAA TCAAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCA GGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTC CCTGTAAACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATC AAGACAATAAAATAGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGT AAATACATTAGTGGAAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTA AGTGCAAAAATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTG CGAAATTTGGTACAGCATTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAACTTCGG CGCAATCAGTGAAGGGAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTTAAACAAATTTA CTATAACGTGAATGTTAATGAACCTACAAGACCTTCCAGATTTTTTCGGCAAAGCT GTTACTAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGAGTGAATGCAGAAAATCCTCCTGCA TATATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTATTTGAAATTATCAACTAATT CCCATAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAAATCTG TCTCAGGTGATGTAGAACTAACAAATATCATCAAAAATTCTTCCTTCAAAGCCGT AATTTACGGAGGTTCCGCAAAAGATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGG AGACTTACGCGATATTTTGAAAAAAGGCGCTACTTTTAATCGAGAAACACCAGG

AGTTCCCATTTGCTTATACAACAACTTCCTAAAAGACAATGAATTAGCTGTTATT AAAAACAACCTCAGAATATATTGAAACAACCTTCAAAGCTTATACAGATGGAAAAA TTAACATCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTCAACATTTCTTGGGATGA AGTAAATTATGAT
Secuencia de aminoácidos de LLO441 (SEQ ID NO: 20)
MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHAD EIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNPVPRKGYKDGNEYIVVEKKKKKSNQNNADIQ VVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNA TKSNVNNNAVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVN NSLNVNFGAISEGKMQEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVN AENPPAYISSVAYGRQVYLKSTNSHSTKVKAADFDAVSGKSVSGDVELTNIKNSS FKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKDNE LAVIK NNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYD
Secuencia de nucleótido de LLO441ΔPEST (SEQ ID NO: 21)
ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGC GCAACAAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATACGCCAATCGAAAAGAA ACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAAT GTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTAC AAAGATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAA ATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTCGAGCCTAACCTATCCAGGTG CTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTG TAAACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGA CAATAAAATAGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAAT ACATTAGTGGAAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGT GCAAAAATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCGA AATTTGGTACAGCATTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAACTTCGGCGC AATCAGTGAAGGGAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTAT AACGTGAATGTTAATGAACCTACAAGACCTCCAGATTTTTCGGCAAAGCTGTTA CTAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAATGCAGAAAATCCTCCTGCATATA TCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTATTTGAAATTATCAACTAATTCCCA TAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAAATCTGTCTC AGGTGATGTAGAACTAACAAATATCATCAAAAATTCTTCCTTCAAAGCCGTAATT TACGGAGGTTCCGCAAAAGATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGA CTTACGCGATATTTTGAAAAAAGGCGCTACTTTTAATCGAGAAACACCAGGAGT TCCCATTGCTTATACAACAACTTCCTAAAAGACAATGAATTAGCTGTTATTAA

AACAACCTCAGAATATATTGAAACAACTTCAAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTA
ACATCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTCAACATTTCTTGGGATGAAG
TAAATTATGAT

Secuencia de aminoácidos de LLO441ΔPEST (SEQ ID NO: 22)

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTAKDASAFNTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVY
HGDAVTNVPPrKGYKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANS
ELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNVNTLVERWNE
KYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQLIKFGTAFKAVNNSLVNFGAISEGKMQUEE
VISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYL
KLSTNSHSTKVKAADFDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGN
LGDLRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNElavikNNSEYIETTSKAYTDGKINI
DHSGGYVAQFNISWDEVNYD

Secuencia de nucleótido de LLO441Δ26 (SEQ ID NO: 23)

ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGC
GCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAGAAATCGATAA
GTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGAT
GCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATATT
GTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAATAATGCAGACATTCAAGTT
GTGAATGCAATTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCG
GAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTGTAAAACGTGATTCATTAACAC
TCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAATAAAATAGTTGTAAAAAA
TGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACATTAGTGGAAAGATGGAA
TGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCAAAAATTGATTATGATGAC
GAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCGAAATTTGGTACAGCATTAAAG
CTGTAAATAATAGCTTGAATGTAACTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAATGC
AAGAAGAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACC
TACAAGACCTTCCAGATTTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAAGC
GCTTGGAGTGAATGCAGAAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGG
CCGTCAAGTTTATTTGAAATTATCAACTAATTCCTAGTACTAAAGTAAAAGCT
GCTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAAATCTGTCTCAGGTGATGTAGAACTAACA
AATATCATCAAAAATTCTTCCTTCAAAGCCGTAATTTACGGAGGTTCCGCAAAAG
ATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGACTTACGCGATATTTTAAAAA
AAGGCGCTACTTTTAATCGAGAAACACCAGGAGTTCCCATTTGCTTATACAACAA
ACTTCCTAAAAGACAATGAATTAGCTGTTATTAACAACTCAGAATATATTGA
AACAACCTTCAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTAACATCGATCACTCTGGAGG

ATACGTTGCTCAATTCAACATTTCTTGGGATGAAGTAAATTATGAT
Secuencia de aminoácidos de LLO441Δ26 (SEQ ID NO: 24)
MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKEEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTN VPPRKGKYKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQP DVLVPKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYP NVSAKIDYDDEMAYSESQLIKFGTAFKAVNNSLVNFGAISEGKMQUEEVISFKQIY YNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSTNSH STKVKAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDLRDI LKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKDNELAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGY VAQFNISWDEVNYD
Secuencia de nucleótido de ActAN100 (SEQ ID NO: 31)
GTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTTCATTACTGCCAACT GCATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAGATAGCGAAGATTCCA GTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAAAAACAGAAGAGCAGCCAAGCGAG GTAAATACGGGACCAAGATACGAACTGCACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATT GAGGAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAAAAATACGAACAAAGCAGACCTAATA GCAATGTTGAAAGCAAAGCAGAGAAAGGT
Secuencia de aminoácidos de ActAN100 (SEQ ID NO: 32)
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEEKTEEQPSEVNT GPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNNTNKADLIAMLKAKAEKG

Los componentes de actAp-ActAN100*-EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂-
parada (SEQ ID NO: 1) son: promotor actA (minúsculas); ActAN100*
(mayúsculas); engarce de clonación BamHI (primer subrayado); EGFRvIIIx5
(cursivas); engarce de clonación MfeI (segundo subrayado); Mesotelina₃₅₋₆₂₂
5 (negrita); codón de parada (taa).

Los componentes de la secuencia de aminoácidos de la proteína de
fusión ADU-214 (SEQ ID NO: 8) son: ActAN100* (texto normal); GS: engarce
de clonación BamHI (subrayado doble); QL: engarce de clonación MfeI
(subrayado punteado); EGFRvIIIx5 (cursivas); Mesotelina₃₅₋₆₂₂ (negrita).

10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una
proteína de fusión que comprende un polipéptido de variante III de receptor de
factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII) fusionado a un polipéptido de
mesotelina.

15 En algunas realizaciones, dicho polipéptido de EGFRvIII comprende una
secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o

iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, dicha proteína de fusión comprende una diversidad de polipéptidos de EGFRvIII. En una realización, dicha proteína de fusión comprende cinco copias del polipéptido de EGFRvIII.

5 En algunas realizaciones, dicho polipéptido de EGFRvIII está flanqueado por una o más secuencias escisoras. En algunas realizaciones, el polipéptido de EGFRvIII está en N-terminal respecto del polipéptido de mesotelina.

En algunas realizaciones, el polipéptido de mesotelina comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o
10 iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende uno o más polipéptidos de EGFRvIII, comprendiendo cada uno de los cuales una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o
15 iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende un polipéptido de EGFRvIIIx5 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a
20 EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

25 En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende además una
30 secuencia de señal, en donde la secuencia de señal está en fase de lectura traduccional con el polipéptido de EGFRvIII y el polipéptido de mesotelina. En algunas realizaciones, la secuencia de señal es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100* tal como se expone en la SEQ ID NO: 12.

35 En algunas realizaciones, la proteína de fusión de cualquiera de las

realizaciones anteriores comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 8.

5 En algunas realizaciones, dicha proteína de fusión se expresa en una bacteria. En una realización, la bacteria es *Listeria monocytogenes*.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las realizaciones anteriores.

10 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende uno o más polinucleótidos de *EGFRvIII* que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

15 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

20 En algunas realizaciones, dicha molécula de ácido nucleico forma parte de un casete de expresión.

25 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones anteriores. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una bacteria. En una realización, la bacteria es *Listeria monocytogenes*. En algunas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de eliminación de *actA*, un mutante de inserción de *actA*, un mutante de eliminación de *inIB*, y un mutante de inserción de *inIB*, o una de sus combinaciones. En determinadas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de $\Delta actA/\Delta inIB$.

30 En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se integra en el genoma de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se integra en el locus de *ARNt^{Arg}*.

35 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las

realizaciones anteriores.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina, en donde la proteína de fusión comprende uno o más polipéptidos de EGFRvIII, comprendiendo cada uno de los cuales una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de EGFR-mesotelina que comprende un polipéptido de EGFRvIIIx5 comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de EGFR-mesotelina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal está en fase traduccional con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de EGFRvIII y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de mesotelina. En determinadas realizaciones, la secuencia de señal es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a ActAN100* tal como se expone en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende además un promotor. En diversas realizaciones, el promotor es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a un promotor actA tal como se expone en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el promotor es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a un promotor *hly* tal como se expone en la SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de cualquiera de

las realizaciones anteriores comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1.

5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones anteriores. En determinadas realizaciones, dicha célula hospedadora es una bacteria. En una realización, dicha bacteria es *Listeria monocytogenes*. En diversas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de eliminación de *actA*, un mutante de inserción de *actA*, un mutante de eliminación de *inlB*, y un mutante de inserción de *inlB*, o una de sus combinaciones. En determinadas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de $\Delta actA/\Delta inlB$. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se integra en el genoma de la célula hospedadora. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se integra en el locus de *ARNt^{Arg}*.

15 En algunas realizaciones, la célula hospedadora se encuentra combinada con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la célula hospedadora de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un vector que codifica la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones anteriores.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para desencadenar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende, administrar al sujeto una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina.

25 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende uno o más polinucleótidos de *EGFRvIII* que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idénticos, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

35 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un

99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

- 5 En diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1.

 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico está integrada en el genoma de dicha célula hospedadora. Por ejemplo, la molécula de ácido
10 nucleico se integra en el locus de *ARN^{tArg}*.

 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, la célula hospedadora es *Listeria monocytogenes*. En determinadas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de eliminación de *actA*, un mutante de inserción de *actA*, un mutante de eliminación de *inlB*, y un mutante de
15 inserción de *inlB*, o una de sus combinaciones. En una realización, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de $\Delta actA/\Delta inlB$.

 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, la etapa de administración se lleva a cabo por vía intravenosa. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión se expresa y secreta a partir de una célula
20 hospedadora en el citosol de una célula infectada dentro del sujeto. En una realización, la célula infectada es una célula presentadora de antígenos.

 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina comprende uno o más polipéptidos de EGFRvIII que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos al
25 menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

30 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina comprende un polipéptido de EGFRvIIIx5 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende
35 una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica,

o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión de un polipéptido de mesotelina que comprende expresar en una célula hospedadora una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de *EGFRvIII* y un polinucleótido de *mesotelina* que codifica el polipéptido de mesotelina.

En algunas realizaciones, el polinucleótido de EGFRvIII es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 4.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una pluralidad de polinucleótidos de *EGFRvIII*, en donde cada polinucleótido de *EGFRvIII* comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende cinco copias del polinucleótido de EGFRvIII, en donde el polinucleótido de EGFRvIII es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico o iii) un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 5.

En diversas realizaciones, el polipéptido de mesotelina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende uno o más polinucleótidos de *EGFRvIII* que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90%

idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina³⁵⁻⁶²² tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende además una secuencia de señal, un promotor, o ambos, en donde
5 el promotor, la secuencia de señal, o ambas están unidas operativamente con la secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido de EGFRvIII y la secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido de mesotelina.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95%
10 idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, la célula hospedadora es *Listeria monocytogenes*.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, dicha etapa de expresión comprende infectar una célula de interés con la célula
15 hospedadora. En algunas realizaciones, dicha etapa de expresión comprende administrar la célula hospedadora al sujeto.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dichos
20 métodos administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión EGFRvIII-mesotelina. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa mesotelina, un cáncer que expresa EGFRvIII, o ambos. En algunas realizaciones, el cáncer tiene un nivel elevado de expresión de
25 mesotelina. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón. En diversas realizaciones, el cáncer de pulmón es adenocarcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma de células escamosas NSCLC, carcinoma de células grandes, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es adenocarcinoma NSCLC avanzado o
30 adenocarcinoma NSCLC metastásico. En una realización, el sujeto ha fracasado con la terapia convencional. En algunas realizaciones, el sujeto se ha sometido a cirugía, radiación, quimioterapia, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina
35 comprende un polipéptido de EGFRvIII que tiene una secuencia de

aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 9. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión comprende una diversidad de polipéptidos de EGFRvIII. En una realización, la proteína de fusión comprende cinco copias del polipéptido de EGFRvIII.

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina comprende un polipéptido de mesotelina que tiene una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina comprende uno o más polipéptidos de EGFRvIII que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 9 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 10 y un polipéptido de mesotelina que comprende una secuencia de aminoácidos al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone como los restos de aminoácido 89 a 840 de la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de EGFRvIII-mesotelina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 8.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende uno o más polinucleótidos de *EGFRvIII* que son al menos i) un 90% idénticos, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idénticos al polinucleótido de EGFRvIII tal como se expone en la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido de mesotelina que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un

99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de EGFRvIIIx5 tal como se expone en la SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntico, o iii) un 99% idéntico al polinucleótido de mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a actAp-ActAN100*-EGFRvIII-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a EGFRvIIIx5-mesotelina₃₅₋₆₂₂ tal como se expone en la SEQ ID NO: 7.

En determinadas realizaciones, dicha molécula de ácido nucleico se integra en el genoma de la célula hospedadora. En una realización, la molécula de ácido nucleico se integra en el locus de *ARNt^{Arg}*. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es *Listeria monocytogenes*. En determinadas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de eliminación de *actA* ($\Delta actA$), un mutante de inserción de *actA*, un mutante de eliminación de *inlB* ($\Delta inlB$), y un mutante de inserción de *inlB*, o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, la *Listeria monocytogenes* es un mutante de $\Delta actA/\Delta inlB$.

En diversas realizaciones, la proteína de fusión se expresa y secreta a partir de una célula hospedadora en el citosol de una célula infectada dentro del sujeto. En algunas realizaciones, la célula infectada es una célula presentadora de antígenos. En algunas realizaciones, el método comprende además medir los niveles de mesotelina, detectar EGFRvIII, o ambos en una muestra biológica del sujeto antes de administrar la composición.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende suero salino tamponado con fosfato (PBS) y glicerol. En

determinadas realizaciones, la etapa de administración se lleva a cabo por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un antibiótico al sujeto después de administrar la composición. En algunas realizaciones, el antibiótico se administra después de una última dosis de la composición. En determinadas realizaciones, el antibiótico es amoxicilina o trimetoprima/sulfametoxazol.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de la célula hospedadora de cualquiera de las realizaciones anteriores se inserta en un casete de expresión en un plásmido episómico dentro de la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de cualquiera de las realizaciones anteriores y que comprende además una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal está en fase de lectura traduccional con el polipéptido de EGFRvIII y el polipéptido de mesotelina: la secuencia de señal es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a una secuencia de señal de LLO441 tal como se expone en la SEQ ID NO: 20, al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica o iii) un 99% idéntica a una secuencia de señal de LLO441ΔPEST tal como se expone en la SEQ ID NO: 22, o al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica o iii) un 99% idéntica a una secuencia de señal de LLO441Δ26 tal como se expone en la SEQ ID NO: 24.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones anteriores, y que además comprende una secuencia de señal, en donde la secuencia de señal está en fase traduccional con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de EGFRvIII y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de mesotelina: la secuencia de señal es al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a una secuencia de señal de LLO441 tal como se expone en la SEQ ID NO: 20, al menos i) un 90% idéntico, ii) un 95% idéntica, o iii) un 99% idéntica a una secuencia de señal de LLO441ΔPEST tal como se expone en la SEQ ID NO: 22, o al menos i) un 90% idéntica, ii) un 95% idéntica o iii) un 99% idéntica a una secuencia de señal de LLO441Δ26 tal como se expone en la SEQ ID NO: 24.

Las enseñanzas de todas las patentes, solicitudes publicadas y referencias citadas en el presente documento se incorporan al presente

documento por referencia en su totalidad.

- Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito en particular con referencia a las realizaciones ejemplares de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden efectuarse diversos cambios en la forma y detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.
- 5