

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 674**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08708349 .9**
96 Fecha de presentación: **29.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2118292**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **POLIPÉPTIDO E2 DE PAPILOMAVIRUS UTILIZADO PARA LA VACUNACIÓN.**

30 Prioridad:
30.01.2007 EP 07360004
15.05.2007 EP 07360018

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
TRANSGENE SA
PARC D'INNOVATION BOULEVARD GONTHIER D
ANDERNACH
67400 ILLKIRCH GRAFFENSTADEN, FR

72 Inventor/es:
BAUDIN, Martine;
BALLOUL, Jean-Marc y
SILVESTRE, Nathalie

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

ES 2 370 674 T3

DESCRIPCIÓN

Polipéptido E2 de papilomavirus utilizado para la vacunación.

La presente invención se refiere a un vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos dos polipéptidos E2 de papilomavirus, en el que dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de dichos E2 no comprenden una parte de 40 o más nucleótidos contiguos que muestran un porcentaje de identidad de 75% o superior a 75% entre dos cualesquiera de dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2. La invención resulta de muy especial interés en el campo de la inmunoterapia, y más particularmente para tratar pacientes que sufren de una infección persistente por papilomavirus.

Los papilomavirus han sido aislados en varios organismos superiores, en los que infectan los tejidos epiteliales de la piel y mucosas. En la actualidad, se han identificado en el ser humano más de 100 genotipos del papilomavirus humano (HPV) (Stoler, *Int. J. Gynecol. Path.* 19:16-28, 2000), que pueden clasificarse en genotipos de "bajo riesgo" habitualmente asociados a tumores benignos (por ejemplo HPV-6 y HPV-11) y genotipos de "alto riesgo", que se asocian a lesiones con potencial de progresar a lesiones premalignas (por ejemplo la neoplasia intraepitelial cervical, CIN) y finalmente a tumores malignos. Por ejemplo, más de 99% de los cánceres cervicales contienen ADN del HPV y se han identificado cinco genotipos de HPV (HR-HPV) de "alto riesgo" como la causa principal, detectando HPV-16 y HPV-18 en aproximadamente 70% de los cánceres cervicales invasivos diagnosticados en todo el mundo (Clifford *et al.*, *Br. J. Cancer* 88:63-73, 2003), mientras que HPV-31, HPV-33 y HPV-45 explican un 10% adicional (Cohen *et al.*, *Science* 308:618-621, 2005).

Los papilomavirus son virus de ADN de un tamaño reducido circundados por una cápside de proteínas (ver, por ejemplo, Pfister, 1987, en: *The papovaviridae: The Papillomaviruses*, edición de Salzman y Howley, Plenum Press, New York, páginas 1 a 38). El genoma es un ADN circular de doble cadena de aproximadamente 7.900 pares de bases que consta de tres regiones funcionales, las regiones temprana (E), tardía (L) y larga de control (LCR). La LCR contiene secuencias reguladoras de la transcripción, tales como intensificadores y promotores. La región tardía codifica las proteínas estructurales L1 y L2, respectivamente las proteínas de cápside mayor y menor, mientras que la región temprana codifica proteínas reguladoras (E1-E7), presentes predominantemente en el núcleo, que controlan la replicación vírica, la transcripción y la transformación celular.

La proteína E1 es la de mayor tamaño (E1 de HPV-16 presenta una longitud de 649 aminoácidos) y la más conservada codificada por el genoma de papilomavirus. El E1 es una fosfoproteína de unión a ADN con una actividad helicasa dependiente de ATP que requiere la dimerización e interacción con E2 para estimular la replicación vírica (Desaintes y Demeret, *Semin. Cancer Biol.* 7:339-347, 1996; Wilson *et al.*, *Virus Gene* 24:275-290, 2002). La actividad helicasa se ha localizado en el dominio C-terminal de E1 y el dominio de unión a ADN, en el dominio central. La proteína E2 (E2 de HPV-16 presenta una longitud de 365 aminoácidos) es una fosfoproteína de unión a ADN multifuncional que regula la transcripción génica vírica y controla la replicación del ADN (Bechtold *et al.*, *J. Virol.* 77:2021-2028, 2003). La regulación de la transcripción vírica requiere la dimerización y unión de los dímeros de E2 a un sitio de unión a E2 (secuencia de consenso ACCN6GGT), cuyo contexto determina si la transcripción vírica se transactiva o se reprime (Ham *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 16:440-444, 1991; McBride *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:18411-18444, 1991). La E2 también proporciona la represión del promotor p97 de HPLV-16, que controla la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Finalmente, la E2 se encuentra implicada en la distribución del genoma vírico en las células hija. El dominio N-terminal de la E2 de HPV-16 es responsable de la transactivación, de la interacción con E1 y de la estimulación de la replicación, mientras que el dominio C-terminal se encuentra implicado en la unión y dimerización del ADN (McBride *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:510-514, 1989). La proteína codificada por E4 se une y altera la red citoplasmática de queratina y desempeña un papel en la maduración vírica. Todavía no se conoce con exactitud cuál es la función de la proteína E5. Las proteínas E6 y E7 se encuentran implicadas en la transformación oncogénica de las células infectadas por HR-HPV (Kanda *et al.*, *J. Virol.* 62:610-613, 1988; Vousden *et al.*, *Oncogene Res.* 3:1-9, 1988; Bedell *et al.*, *J. Virol.* 61:3635-3640, 1987) a través de la unión de estas proteínas víricas a los productos génicos celulares de supresión tumoral p53 y retinoblastoma (Rb), respectivamente (revisados en Howley, *Papillomaviruses and their replication*, páginas 2045 a 2076, en: B.N. Fields, D.M. Knipe y P.M. Howley (editores), *Virology*, 3a edición, Lippincott-Raven Press, New York, N.Y., 1996).

La infección por el HPV es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes y aproximadamente 25% de los adultos sexualmente activos se encuentran infectados por HPV (Woodman *et al.*, *The Lancet* 357:1831-1836, 2001). Aproximadamente el 80% de los sujetos consiguen erradicar espontáneamente el virus en 6 a 12 meses (Ho *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 338:423-428, 1998). Sin embargo, en el 20% restante, la infección por HPV progresa a lesiones premalignas CIN que, si no se diagnostican, pueden conducir a cánceres invasivos (O'Shaughnessy *et al.*, *Clinical Cancer Research* 2:314-346, 2002). El mecanismo inductor de la neoplasia aparentemente implica la integración del genoma del HPV en los cromosomas celulares (Cullen *et al.*, *J. Virol.* 65:606-612, 1991). En mayoría de casos, lo anterior lleva a la interrupción del ADN genómico del HPV en la región E1/E2, a la liberación del promotor E6/E7 del efecto represor de E2 y en consecuencia a la regulación positiva de la expresión de E6 y E7 y a la transformación celular.

En la actualidad, las vacunas profilácticas destinadas a prevenir la infección por HPV están próximas a

comercializarse. Presentan como diana proteínas de la cápside expresadas en la superficie vírica, con el fin de bloquear al virus antes de que penetre en las células huésped principalmente mediante la inducción de anticuerpos neutralizadores. Generalmente se basan en proteínas L1 de producción recombinante que se reensamblan espontáneamente formando VLP (partículas similares a virus). Dos vacunas para HPV fabricadas por Merck y GlaxoSmithKline (GSK) han completado con éxito los ensayos clínicos de fase III mostrando una eficacia de prácticamente el 100% en la prevención de infecciones cervicales de tipo específico. La vacuna de GSK comprende una mezcla de VLP de HPV-16 y HPV-18, mientras que Merck también ha incluido VLP de HPV-6 y HPV-11, que causan verrugas genitales.

Sin embargo, los sujetos ya infectados por HPV no pueden seleccionarse para la vacunación profiláctica y las vacunas terapéuticas resultarían de interés para tratar a los pacientes infectados con riesgo de desarrollar lesiones con potencial oncogénico. Debido a que la actividad oncogénica se ha atribuido a la expresión de los genes E6 y E7 del HPV en las células infectadas, se ha dedicado mucho esfuerzo a bloquear su expresión o a inducir una respuesta inmunológica celular contra dichos productos génicos transformantes. Se han descrito numerosos enfoques en la literatura, por ejemplo basados en la utilización de ARN antisentido (Steele *et al.*, Cancer Res. 53:2330-2337, 1993; He *et al.*, Cancer Res. 57:3993-3999, 1997; Choo *et al.*, Gynecol. Oncol. 78:293-301, 2000), ribozimas (Chen *et al.*, Cancer Gen. Ther. 3:18-23, 1996; Pan *et al.*, Mol. Ther. 9:596-606, 2004), ARNip (Butz *et al.*, Oncogene 22:5938-5945, 2003; Koivusalo *et al.*, Mol. Pharmacol. 68:372-382, 2005), péptidos inmunogénicos (Feltkamp *et al.*, Eur. J. Immunol. 23:2242-2249, 1993), plásmidos codificantes de E6 y/o E7 (Peng *et al.*, J. Virol. 78:8468-8476, 2004) y vectores víricos (documentos WO 90/10459 y 99/03885; Kaufmann *et al.*, Clinical Cancer Res. 8:3676-3685, 2002).

Debido a que se expresa en un estadio temprano de la infección por HPV, la proteína E2 representa una segunda diana potencial para la vacunación terapéutica. Los estudios preclínicos realizados en conejos infectados por papilomavirus de la cola de algodón del conejo (CRPV) han demostrado protección frente a lesiones implementadas asociadas a papilomavirus tras la expresión de E2. Por ejemplo, la administración de un vector adenovirus recombinante que expresa la proteína E2 de CRPV resultó en la eliminación del papiloma inducido por CRPV y la infección, probablemente a través de inmunidad mediada por células (Brandsma *et al.*, J. Virol. 78:116-123, 2004). La administración de ADN codificante de las proteínas E1 y E2 del CRPV también resultó efectiva para prevenir o por lo menos para retrasar el desarrollo de carcinoma a partir de papilomas de la piel inducidos por el CRPV (Han *et al.*, J. Virol. 74:9712-9716, 2000), aunque se demostró que la inmunidad protectora dependía de la vía de administración (Han *et al.*, Vaccine 18:2937-2944, 2000). El potencial terapéutico de E2 para tratar las lesiones asociadas al papilomavirus también se demostró en sujetos humanos expuestos al HPV. Con frecuencia se detectaba inmunidad de células T ayudantes específicamente anti-E2 en sujetos sanos (De Jong *et al.*, Cancer Res. 62:472-479, 2002), mientras que se observó inmunidad de las células T CD4+ alteradas contra E2 y E6 en mujeres que presentaban cánceres cervicales asociados a HPV-16 (De Jong *et al.*, Cancer Res. 64:5449-5455, 2004).

Se están realizando en la actualidad ensayos clínicos de fase II en pacientes con CIN 2 y 3 de grado alto asociados al HPV utilizando un vector MVA (virus Ankara modificado) recombinante codificante de una proteína E2 de papilomavirus bovino (BPV). Se inyectan las partículas víricas directamente en las lesiones de CIN y se espera que la producción de E2 en las células que expresan E6 y E7 conduzca a la apoptosis de las mismas. En efecto se observó una regresión de las lesiones de CIN en la mayoría de los pacientes tratados. Sin embargo, en algunos casos, no se eliminó el ADN vírico y se detectó la recurrencia de las lesiones 1 año después (García-Hernández *et al.*, Cancer Gene Ther. 13:592-597, 2006).

Se prevé que el HPV continúe siendo una amenaza sanitaria global grave durante muchos años debido a la naturaleza persistente de la infección, su elevada prevalencia y la morbilidad significativa de los cánceres inducidos por HPV. En efecto se ha demostrado que las mujeres con infección persistente por HR-HPV presentan un riesgo significativamente más alto, hasta 200 veces superior, de desarrollar lesiones de CIN en comparación con mujeres no infectadas o mujeres que consiguen eliminar el virus espontáneamente (Bory *et al.*, Int. J. Cancer 102:519-525, 2002).

La infección por HPV generalmente se detecta tras un cribado anormal (por ejemplo un ensayo citológico Papanicolau). En la actualidad, la única ventaja médica del diagnóstico de la infección por HPV es la implementación de un seguimiento más frecuente con el fin de detectar las lesiones (por ejemplo CIN2/3 de grado alto) en cuanto se producen, que en este caso pueden eliminarse mediante procedimientos ablativos tales como la excisión con asa electroquirúrgica (LEEP) y la biopsia cónica (conización). Dichos procedimientos son eficientes globalmente al 90%; sin embargo, presentan un riesgo de complicaciones obstétricas (por ejemplo con incidencia en el potencial reproductivo de la mujer en edad de procrear). Además de que no resultan totalmente satisfactorios desde un punto de vista médico, también implican incomodidad para el paciente (ansiedad).

Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar una vacuna para tratar los pacientes con infección persistente por HPV, especialmente en vista del elevado riesgo en esta población de progresión a lesiones premalignas y finalmente a cáncer.

De esta manera, la presente invención representa un avance significativo en este contexto. La presente descripción

proporciona un procedimiento no invasivo y seguro que ofrece una protección más temprana frente a infecciones causadas por genotipos de HR-HPV. Presenta la ventaja de proporcionar un tratamiento de los pacientes infectados antes de producirse las lesiones asociadas a papilomavirus y, en consecuencia, de reducir los riesgos asociados a los procedimientos ablativos convencionales (por ejemplo complicaciones obstétricas), incrementando la comodidad para el paciente (por ejemplo reduciendo la ansiedad asociada al reconocimiento de las lesiones). Resulta importante que la presente invención también podría permitir la reducción del riesgo de incidencias futuras de reinfección por HPV a través de la erradicación del papilomavirus infeccioso y aislados del mismo relacionados.

La presencia de secuencias homólogas en un vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos dos polipéptidos E2 de papilomavirus se espera que influya negativamente sobre su estabilidad, especialmente durante la etapa de producción del vector. Puede producirse la recombinación entre las secuencias homólogas, posiblemente conduciendo a la pérdida de la parte comprendida entre las dos secuencias homólogas.

En el documento WO 92/16636, dicho problema se trata disponiendo una pareja de secuencias de nucleótidos homólogas en el vector vírica de manera que se encuentren invertidas una respecto a la otra.

En el vector de la invención, este problema técnico se resuelve mediante la provisión de las formas de realización definidas en las reivindicaciones.

Resultarán evidentes otros aspectos y aspectos, características y ventajas adicionales de la presente invención a partir de la descripción siguiente de las formas de realización actualmente preferidas de la invención. Estas formas de realización se proporcionan con el fin de su publicación.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos dos polipéptidos E2 de papilomavirus, en los que dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2 no comprenden una parte de 40 o más nucleótidos contiguos que muestran una identidad de 75% o superior al 75% entre dos cualesquiera de dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2.

Tal como se utiliza en la presente memoria a lo largo de la solicitud, los términos "un" y "una" se utilizan en el sentido de "por lo menos una", "por lo menos un primer", "uno o más" o "una pluralidad" de los compuestos o etapas referenciados, a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un polipéptido E2 de papilomavirus" comprende un tipo único de polipéptido E2 de papilomavirus o una pluralidad de polipéptidos E2 de papilomavirus que incluye una mezcla de los mismos.

El término "y/o" según se utiliza en la presente memoria incluye el significado de "y", "o" y "la totalidad o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

El término "alrededor de" o "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria significa dentro del 20%, preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5% de un valor o intervalo dado.

Los términos "aminoácidos" y "residuos" son sinónimos y comprenden los aminoácidos naturales, así como los análogos de aminoácidos (por ejemplo aminoácidos no naturales, sintéticos y modificados, incluyendo los isómeros ópticos D o L).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" tal como se utilizan en la presente memoria intercambiamente se refieren a polímeros de residuos aminoácidos que comprenden nueve o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El polímero puede ser lineal, ramificado o cíclico y puede comprender aminoácidos naturales y/o análogos de aminoácidos y puede encontrarse interrumpido por no aminoácidos. A título de indicación general, en el caso de que el polímero de aminoácidos sea largo (por ejemplo de más de 50 residuos aminoácidos), preferentemente se hace referencia al mismo como polipéptido o proteína, mientras que en el caso de que presente una longitud de 50 aminoácidos o superior, se denomina "péptido".

Las expresiones "ácido nucleico", "molécula de ácidos nucleicos", "polinucleótido" y "secuencia de nucleótidos" se utilizan en la presente memoria intercambiamente y definen un polímero de cualquier longitud de polidesoxirribonucleótido (ADN) (por ejemplo ADNc, ADN genómico, plásmidos, vectores, genomas víricos, ADN aislado, sondas, cebadores y cualquier mezcla de los mismos) o moléculas de polirribonucleótido (ARN) (por ejemplo ARNm o ARN antisentido) o polirribo-polidesoxirribonucleótidos mixtos. Comprenden polinucleótidos de una cadena o de doble cadena, lineales o circulares, naturales o sintéticos. Además, un polinucleótido puede comprender nucleótidos no naturales, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótido (ver las patentes US nº 5.525.711, nº 4.711.955 o EP-A-302 175 a título de ejemplos de modificaciones) y pueden encontrarse interrumpidos por componentes no nucleótidos. En caso de encontrarse presentes, las modificaciones de los nucleótidos pueden realizarse antes o después de la polimerización.

Tal como se utiliza en la presente memoria, en su utilización para definir productos, composiciones y métodos, la expresión "que comprende" pretende referirse a que los productos, composiciones y métodos incluyen los

componentes o etapas referenciados, aunque sin excluir otros. La expresión "que consta esencialmente de" pretende referirse a que se excluyen otros componentes o etapas de cualquier significación esencial. De esta manera, una composición que consta esencialmente de los componentes indicados no excluiría componentes traza ni portadores farmacéuticamente aceptables. La expresión "que consta de" se refiere a que se excluyen más que elementos traza de otros componentes o etapas. Por ejemplo un polipéptido "consta de" una secuencia de aminoácidos en el caso de que el polipéptido no contenga otro aminoácido que la secuencia de aminoácidos indicada. Un polipéptido "consta esencialmente de" una secuencia de aminoácidos en el caso de que dicha secuencia de aminoácidos se encuentre presente conjuntamente con sólo unos cuantos residuos aminoácidos adicionales, típicamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 residuos adicionales. Un polipéptido "comprende" una secuencia de aminoácidos en el caso de que la secuencia de aminoácidos sea por lo menos parte de la secuencia de aminoácidos final del polipéptido. Dicho polipéptido puede presentar entre unos cuantos y varios cientos de residuos aminoácidos adicionales. Dichos residuos aminoácidos adicionales pueden desempeñar un papel en el tráfico de polipéptidos, facilitar la producción o purificación de los polipéptidos y prolongar la vida media, entre otros aspectos. Lo mismo resulta de aplicación a las secuencias de nucleótidos.

La expresión "célula huésped" debe entenderse ampliamente de manera que comprenda células aisladas, un grupo de células, así como una organización particular de células, por ejemplo en un tejido u órgano. Dichas células pueden ser células primarias, transformadas o en cultivo. Pueden ser procarióticas (por ejemplo de *Escherichia coli*), de levadura (por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* o *Pichia pastoris*), eucarióticas (por ejemplo células de insecto, vegetales y de mamífero, incluyendo humanas). La expresión "célula huésped" incluye células que pueden ser o han sido receptoras de la molécula de ácidos nucleicos, del vector o de la partícula vírica infecciosa utilizados en la presente invención y la progenie de dichas células.

La expresión "organismo huésped" se refiere a un vertebrado, en particular a un miembro de la especie de mamífero y especialmente animales domésticos, animales de granja, animales de competición y primates, incluyendo seres humanos. Preferentemente, el organismo huésped es un paciente que sufre una infección persistente por papilomavirus causada por como mínimo un papilomavirus.

El término "papilomavirus" se refiere a un virus que pertenece a la subfamilia *papilomavirinae*. La definición comprende los papilomavirus animales de origen, que comprenden de manera no limitativa vacas, caballos, conejos, ovejas, perros, primates no humanos y roedores, así como el papilomavirus humano (HPV).

El término "HPV" se refiere más concretamente al papilomavirus de origen la especie humana y/o al que puede infectar un ser humano. Se han identificado más de 100 genotipos de HPV en la actualidad y se han numerado según el orden cronológico de aislamiento. Convencionalmente la clasificación de los HPV se basa en el grado de relación de sus genomas. Se ha construido un árbol filogenético a partir de la alineación de las secuencias de nucleótidos disponibles (Van Ranst *et al.*, J. Gen. Virol. 73:2653, 1992; De Villiers *et al.*, Virology 324:17-27, 2004). El HPV puede clasificarse en "de alto riesgo" (HR-HPV) y "de bajo riesgo" (LR-HPV). El HR-HPV se refiere al HPV estrechamente asociado a la transformación celular que puede llevar a lesiones con el potencial de progresar a lesiones malignas. Entre los tipos de HR-HPV se incluye, aunque sin limitación, HPV-16, HPV-18, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-70 y HPV-85. El LR-HPV se refiere a HPV que presenta un potencial de transformación celular débil, que puede llevar a lesiones benignas, tales como verrugas con un potencial bajo de progreso a lesiones malignas. Entre los tipos de LR-HPV se incluyen, aunque sin limitación, HPV-6 y HPV-11.

Los papilomavirus pueden aislarse, clonarse o derivarse a partir de cualquier fuente en la naturaleza. Entre dichas fuentes se incluyen las muestras biológicas, las células cultivadas, así como los materiales recombinantes. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "muestra biológica" comprende una diversidad de muestras recogidas de un organismo huésped que ha sido expuesto a un papilomavirus que pueden utilizarse como fuente de papilomavirus o en un ensayo diagnóstico o de seguimiento. En el contexto de la invención, una muestra biológica puede haberse manipulado de cualquier modo después de su recolección, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para determinados componentes (por ejemplo polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos). La definición comprende líquidos biológicos (por ejemplo sangre, plasma o sueros), muestras líquidas (por ejemplo muestras vaginales, líquidos cervicales y muestras citológicas), muestras de tejido sólido (por ejemplo secciones de tejido, especímenes de biopsia) y cultivos de tejidos. La expresión "células cultivadas" comprende las células en cultivo (por ejemplo las células CaSki disponibles de la ATCC), sobrenadantes celulares y lisados celulares. Los materiales recombinantes comprenden de manera no limitativa los papilomavirus (por ejemplo disponibles en instituciones de depósito), el genoma de papilomavirus, las bibliotecas genómicas o de ADNc, los plásmidos que contienen uno o más fragmentos de genoma de papilomavirus o cualquier vector de la técnica anterior que se conozca que incluye dichos elementos.

A título de información general, las secuencias de nucleótidos de varios genomas de papilomavirus y las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados han sido descritos en la literatura y se encuentran disponibles en bancos de datos especializados, por ejemplo los números de acceso de Genbank NC_01526 y K02718 en relación a HPV-16; NC_001375 y X05015 en relación a HPV-18; J04353 en relación a HPV-31; M12732 en relación a HPV-33; NC_001529 en relación a HPV-35; NC_001535 en relación a HPV-39; X74479 en relación a HPV-45; NC_001533 en

relación a HPV-51; NC_001592 en relación a HPV-52; X74483 en relación a HPV-56; D90400 en relación a HPV-58; NC_001635 en relación a HPV-59; X67160 y M73258 en relación a HPV-68; U21941 en relación a HPV-70 y AF131950 en relación a HPV-85.

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polipéptido E2 de papilomavirus" comprende polipéptidos E2 nativos (es decir, expresados a partir de un ORF de E2 en una fuente natural de papilomavirus), polipéptidos E2 modificados y péptidos inmunogénicos de los mismos.

10 Un péptido E2 inmunogénico presenta por lo menos 9 aminoácidos y este término incluye los epítomos de E2 (por ejemplo motivos aminoácidos específicos que pueden inducir o activar una respuesta inmunológica a través de una ruta mediada por el MHC de clase I y/o II, tal como los indicados en el documento EP 523 395), un constructo multiepítomo (por ejemplo tal como se describe en el documento WO 2005/089164) y polipéptidos E2 truncados. El truncado puede variar entre 1 y 300 residuos aminoácidos que pueden ser contiguos o no y localizarse en el extremo N-terminal y/o C-terminal y/o internamente.

15 El polipéptido E2 codificado por la molécula de ácidos nucleicos comprendida en el vector de la invención puede originarse a partir de cualquier genotipo de papilomavirus, con especial preferencia para un genotipo de HR-HPV tal como uno seleccionado de entre el grupo que consta de los listados anteriormente, y más particularmente HPV-16, HPV-18, HPV-33 o HPV-52 o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo tanto HPV-16 como HPV-18). Se ha descrito en la literatura un gran número de polipéptidos E2 nativos, por ejemplo E2 de HPV-18 en Cole *et al.* (J. Mol. Biol. 193:599-608, 1987), E2 de HPV-16 en Seedorf *et al.* (Virology 145:181-185, 1985) y Kennedy *et al.* (J. Virol. 65:2093-2097, 1991), E2 de HPV-31 en Goldsborough *et al.* (Virology 171:306-311, 1989), E2 de HPV-33 en Cole *et al.* (J. Virol. 58:991-995, 1986) y E2 de BPV-1 del papilomavirus bovino en Chen *et al.* (Nature 299:529-534, 1982) y en Danos *et al.* (J. Virol. 46:557-566, 1983). A título ilustrativo, la secuencia de aminoácidos del polipéptido E2 de HPV-16 se proporciona en SEC ID n° 1.

25 Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada a dichas secuencias ejemplificativas. En efecto, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos pueden variar entre diferentes aislados de papilomavirus y esta variación genética natural se encuentra comprendida dentro del alcance de la invención, así como una o más modificaciones no naturales tales como las indicadas posteriormente. El término "modificación" incluye la delección, sustitución o adición de uno o más residuos nucleótidos o cualquier combinación de estas posibilidades. En el caso de que estén comprendidas varias modificaciones, pueden referirse a residuos consecutivos y/o a residuos no consecutivos. Puede generarse una o más modificaciones en la molécula de ácidos nucleicos utilizada en la invención mediante varias maneras conocidas por el experto en la materia, tales como la mutagénesis sitio-dirigida (por ejemplo utilizando el sistema de mutagénesis *in vitro* SculptorTM de Amersham, Les Ullis, Francia), la mutagénesis por PCR, la reorganización del ADN y las técnicas sintéticas químicas (por ejemplo que resultan en una molécula sintética de ácidos nucleicos).

30 La modificación o modificaciones comprendidas en la presente invención comprenden modificaciones silenciosas que no modifican la secuencia de aminoácidos del E2 de papilomavirus codificado, así como las modificaciones que se traducen en el polipéptido E2 codificado, resultando en una secuencia de aminoácidos modificada respecto a la nativa correspondiente.

35 Las modificaciones silenciosas al nivel del polipéptido E2 codificado típicamente se llevan a cabo sustituyendo uno o más codones de la secuencia codificante de E2 por uno o más codones codificantes del mismo aminoácido. Mientras que un codón único codifica el residuo Met o Trp, es bien conocido en la técnica que pueden utilizarse 6 codones diferentes para codificar la arginina, la leucina o la serina, y cuatro diferentes para codificar la alanina, la glicina, la prolina, la treonina y la valina. De esta manera, resulta posible modificar la secuencia de nucleótidos codificante de E2 sin alterar la secuencia de aminoácidos. Preferentemente, dichas modificaciones están destinadas a mejorar la expresión del polipéptido E2 de papilomavirus en una célula u organismo huésped dado, por ejemplo en células huésped de mamífero, incluyendo las humanas. Los ejemplos representativos de dichas modificaciones comprenden de manera no limitativa la supresión de uno o más codones utilizados infrecuentemente mediante optimización de codones, la supresión de elementos de secuencia negativos que previsiblemente influyen negativamente sobre los niveles de expresión y/o la supresión de secuencias homólogas que previsiblemente influyen negativamente sobre la estabilidad de la molécula o vector de ácidos nucleicos utilizada en la presente invención.

40 Típicamente, la optimización de codones se lleva a cabo sustituyendo uno o más codones "nativos" (por ejemplo de HPV) correspondiente a un codón utilizado infrecuentemente en la célula huésped de interés por uno o más codones codificantes del mismo aminoácido que se utiliza más frecuentemente. No resulta necesario sustituir todos los codones nativos correspondientes a codones utilizados infrecuentemente debido a que puede conseguirse un nivel incrementado de expresión incluso con la sustitución parcial. Además, pueden realizarse algunas desviaciones respecto a la adherencia estricta a la utilización optimizada de codones para permitir la introducción de uno o más sitios de restricción en la molécula de ácidos nucleicos resultante. Dichas moléculas de ácidos nucleicos de codones optimizados se encuentran descritas en la literatura, por ejemplo en los documentos WO 01/14416, WO 02/08435 y WO 03/018055.

Los ejemplos representativos de elementos de secuencia negativos que resulta adecuado suprimir en el contexto de la invención comprenden de manera no limitativa las regiones que presentan un contenido de GC muy alto (>80%) o muy bajo (<30%); las regiones que presentan un contenido de AT muy alto; las secuencias de repetición directa o invertida inestables; las estructuras secundarias de ARN; y/o los elementos reguladores crípticos internos tales como las cajas TATA internas, los sitios chi, los sitios de entrada ribosómica y/o los sitios donadores/aceptores de procesamiento.

La presencia de secuencias homólogas en el vector según la invención previsiblemente influirá negativamente sobre su estabilidad, especialmente durante la etapa de producción del vector. La recombinación puede producirse entre las secuencias homólogas, conduciendo posiblemente a la pérdida de la parte comprendida entre las dos secuencias homólogas. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencias homólogas" se refiere a secuencias de nucleótidos que conservan un elevado grado de identidad entre sí a lo largo de por lo menos 40, ventajosamente por lo menos 45, preferentemente por lo menos 50, más preferentemente por lo menos 55, o todavía más preferentemente por lo menos 59 nucleótidos consecutivos. Un grado elevado de identidad es 75% o superior a 75%, ventajosamente 80% o superior a 80%, preferentemente 85% o superior a 85%, preferentemente 90% o superior a 90%, más preferentemente 95% o superior a 95%, todavía más preferentemente 97% o superior a 97% (por ejemplo una identidad de secuencia de 100%). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos es una función del número de posiciones idénticas compartido por las secuencias, considerando el número de huecos que resulta necesario introducir para la alineación óptima y la longitud de cada hueco. Se dispone en la técnica de diversos programas informáticos y algoritmos matemáticos para determinar los porcentajes de identidad entre las secuencias de nucleótidos, tales como el paquete del GCG Wisconsin.

La homología entre dos secuencias homólogas de nucleótidos se suprime mediante la degeneración del uso de los codones en por lo menos una de las secuencias homólogas, de manera que el porcentaje de identidad entre las secuencias previamente homólogas se reduce a menos de 75%. Lo anterior puede llevarse a cabo sustituyendo uno o más codones "nativos" (por ejemplo de HPV) presentes en la parte homóloga por uno o más codones codificantes del mismo aminoácido. No resulta necesario degenerar todos los codones nativos debido a que la homología puede reducirse suficientemente con la sustitución parcial. Dichas modificaciones resultan particularmente útiles en el caso de que la molécula de ácidos nucleicos o vector utilizado en la invención codifique dos polipéptidos de papilomavirus, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los cuales se encuentren relativamente conservados (por ejemplo secuencias codificantes de 2 o más polipéptidos E2, tales como los polipéptidos E2 de HPV-16 y de HPV-18) o que contengan una parte común (por ejemplo las secuencias codificantes de E1 y E2 de HPV-16, que comparten 59 nucleótidos). Un ejemplo representativo de dicha forma de realización se proporciona en SEC ID n° 6, proporcionando un ejemplo de secuencias degeneradas correspondientes a la parte de 59 nucleótidos presente en tanto en secuencias codificantes de E1 como en secuencias codificantes de E2.

Las modificaciones que se traducen al nivel del polipéptido E2 codificado resultan en la mutación de uno o más residuos aminoácidos del polipéptido E2. Ventajosamente, el polipéptido E2 modificado conserva un grado elevado de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido nativo correspondiente a lo largo de la secuencia de aminoácidos de longitud completa o un fragmento de la misma (por ejemplo de una longitud de por lo menos 9, 20, 50, 100, 200 o 300 aminoácidos), que es de 75% o superior a 75%, ventajosamente superior a 80%, preferentemente superior a 85%, preferentemente superior a 90%, más preferentemente superior a 95%, todavía más preferentemente superior a 97% (por ejemplo una identidad de secuencia de 100%). El porcentaje de identidad entre dos polipéptidos es una función del número de posiciones idénticas compartido por las secuencias, considerando el número de huecos que resulta necesario introducir para la alineación óptima y la longitud de cada hueco. Se encuentran disponibles en la técnica diversos programas informáticos y algoritmos matemáticos para determinar los porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos, tales como, por ejemplo, el programa W2H HUSAR y el programa Blast (por ejemplo Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Altschul *et al.*, FEBS J. 272:5101-5109, 2005), disponibles de NCBI.

En una forma de realización, la molécula de ácidos nucleicos comprendida en el vector de la invención se modifica de manera que codifique un polipéptido E2 defectuoso en por lo menos una de las actividades biológicas de un polipéptido E2 nativo, y más particularmente defectuoso para la activación de la replicación y/o transcripción vírica. Los aminoácidos que resultan críticos para dichas actividades biológicas pueden identificarse mediante métodos rutinarios, tales como el análisis estructural y funcional y un experto en la materia podrá determinar fácilmente el tipo de mutación o mutaciones que pueden reducir o anular una actividad biológica dada. Es bien conocido de la técnica que los residuos implicados en las actividades de activación transcripcional y replicación de E2 se encuentran situadas dentro de la parte N-terminal, mientras que la parte C-terminal es responsable del reconocimiento de sitios de unión de E2 en el ADN vírico y de la dimerización. Tal como se utiliza en la presente memoria, la parte N-terminal de E2 incluye los 220 primeros residuos aminoácidos partiendo del iniciador Met. Por ejemplo, puede realizarse la mutagénesis sitio-dirigida o técnicas de PCR para delecionar o sustituir uno o más de los residuos aminoácidos en la parte N-terminal de E2 que regulan la replicación vírica, de manera que se reduzca significativamente o se anule la función o funciones de replicación de E2 y se genere un polipéptido E2 defectuoso para la replicación del genoma de papilomavirus. Alternativamente o en combinación, puede eliminarse o sustituirse uno o más de los residuos aminoácidos dentro de la parte N-terminal de E2 responsables de la activación transcripcional de manera que se

reduzca significativamente o se elimine la capacidad de E2 de activar la transcripción a partir de promotores de papilomavirus. Se describen ejemplos representativos de polipéptidos E2 defectuosos adecuados en la literatura disponible para el experto en la materia, por ejemplo en Demeret *et al.* (Nucleic Acids Res. 23:4777-4784, 1995), Sakai *et al.* (J. Virol. 70:1602-1611, 1996), Brokaw *et al.* (J. Virology 70:23-29, 1996) y Ferguson *et al.* (J. Virology 70:4193-4199, 1996). La reducción o falta de actividades de replicación de E2 y de activación transcripcional puede determinarse fácilmente en ensayos apropiados utilizando métodos estándares conocidos por el experto en la materia (Sakai *et al.*, J. Virol. 70:1602-1611, 1996).

Un polipéptido E2 defectuoso en replicación preferido codificado por el ácido nucleico comprendido en el vector de la invención se origina a partir de HPV-16 y comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 1 excepto en que por lo menos el residuo Glu en la posición 39 (E39) se ha modificado, por ejemplo se sustituido por cualquier residuo aminoácido aparte de Glu. Otro polipéptido E2 preferente defectuoso para la activación transcripcional se origina a partir de HPV-16 y comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 1 excepto en que por lo menos el residuo Ile en la posición 73 (I73) se ha modificado, por ejemplo sustituido por cualquier residuo aminoácido aparte de Ile. Un polipéptido E2 todavía más preferente defectuoso tanto para la replicación como la activación transcripcional se origina a partir de HPV-16 y comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 1 excepto en que por lo menos el residuo Glu (E39) en la posición 39 y el residuo Ile en la posición 73 (I73) han sido modificados, por ejemplo sustituidos por cualquier residuo aminoácido aparte de Glu e Ile en las posiciones respectivas 39 y 73. Más preferentemente, el residuo Glu en la posición 39 y/o el residuo Ile en la posición 73 se sustituyen por un residuo Ala (E39A y/o I73A). En el contexto de la invención, dicho polipéptido E2 defectuoso puede originarse a partir de cualquier papilomavirus y se encuentra comprendido dentro de las capacidades del experto en la materia adaptar las modificaciones descritas en relación a E2 de HPV-16 a un polipéptido E2 originado a partir de otro genotipo de papilomavirus (por ejemplo el residuo o residuos aminoácidos situados en una posición equivalente a la posición 39 y/o a la posición 73 de E2 de HPV-16 pueden identificarse mediante comparación entre secuencias y modificarse mediante técnicas estándares). A título ilustrativo, dichos residuos corresponden, respectivamente, a la Glu en la posición 43 y a la Ile en la posición 77 en E2 de HPV-18, a la Glu en posición 39 y a Ile en posición 73 en HPV-33 y HPV-52.

En otra forma de realización, la molécula de ácidos nucleicos comprendida en el vector de la invención se modifica de manera que codifique una fusión entre un polipéptido E2 de papilomavirus y una o más parejas de fusión, en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal o en ambos extremos de E2. La pareja de fusión puede originarse a partir de un papilomavirus o no. La fusión puede llevarse a cabo por medios genéticos, es decir mediante la fusión en el mismo marco de lectura de las secuencias de nucleótidos codificantes del polipéptido E2 y aquellas codificantes de la pareja o parejas de fusión, de manera que la expresión de las secuencias codificantes fusionadas resulta en un único polipéptido. La fusión puede ser directa (es decir, sin ningún residuo aminoácido adicional entre ellas) o mediante un péptido conector para unir el polipéptido E2 con la pareja o parejas de fusión. La presencia de una molécula conectora puede facilitar la formación, plegamiento y/o funcionamiento correctos de la proteína de fusión. Las moléculas conectoras adecuadas según la invención presentan una longitud de entre 2 y 30 aminoácidos y están compuestas de residuos aminoácidos tales como glicina, serina, treonina, asparagina, alanina y/o prolina (ver, por ejemplo, Wiederrecht *et al.*, Cell 54:841, 1988; Aumailly *et al.*, FEBS Lett. 262:82, 1990; y Dekker *et al.*, Nature 362:852, 1993).

Las parejas de unión no de papilomavirus comprenden de manera no limitativa la calreticulina (Cheng *et al.*, J. Clin. Invest. 108:669-678, 2001), la proteína 70 de choque térmico de *Mycobacterium tuberculosis* (HSP70) (Chen *et al.*, Cancer Res. 60:1035-1042, 2000), la ubiquitina (Rodríguez *et al.*, J. Virol. 71:8497-8503, 1997) y la toxina bacteriana, tal como el dominio de traslocación de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (ETA(dIII)) (Hung *et al.*, Cancer Res. 61:3698-3703, 2001).

Las parejas de fusión de papilomavirus adecuadas pueden ser cualquier polipéptido de papilomavirus, tardío o temprano, o cualquier fragmento del mismo. Una pareja de fusión preferente se origina de un polipéptido HPV 5 temprano seleccionado de entre el grupo que consta de E1, E2, E4, E5, E6 y E7 o una mezcla de los mismos. El polipéptido E2 y la pareja de fusión de papilomavirus pueden originarse a partir del mismo genotipo de papilomavirus, tal como la fusión de los polipéptidos E1 y E2 de HPV-16. Alternativamente, el polipéptido E2 y la pareja de fusión de papilomavirus pueden originarse a partir de diferentes genotipos de papilomavirus, siendo un ejemplo representativo la fusión de los polipéptidos E2 de HPV-16 y E2 de HPV-18.

Independientemente o en combinación con la modificación o modificaciones anteriormente definidas, la molécula de ácidos nucleicos comprendida en el vector de la invención puede comprender además modificaciones adicionales que resultan beneficiosas para el procesamiento, estabilidad y/o solubilidad del polipéptido E2 codificado, por ejemplo la supresión de uno o más sitios potenciales de corte, la supresión de uno o más sitios potenciales de glucosilación y/o la presentación del polipéptido E2 codificado en la superficie de las células huésped de expresión. Por ejemplo, la supresión de un sitio potencial de glucosilación puede conseguirse identificando un sitio potencial de N-glucosilación (por ejemplo que comprenda un motivo Asn-Val-Ser-Val) y sustituyendo uno o más residuos aminoácidos por un residuo diferente (por ejemplo sustituyendo el residuo Ser por un residuo Gly o Ala), proporcionando un polipéptido E2 que no puede ser glucosilado al expresarse en una célula u organismo huésped eucariótico.

En una forma de realización preferida, la molécula de ácidos nucleicos comprendida en el vector de la invención se modifica de manera que codifique un polipéptido E2 presentado en la membrana, con el fin de mejorar la presentación del MCH de clase I y/o el MHC de clase II, y de esta manera su potencial inmunogenicidad en la célula u organismo huésped. Anteriormente se ha demostrado que la presentación en la membrana permite mejorar la eficacia terapéutica de los polipéptidos E6 y E7 de HPV-16 (ver, por ejemplo, el documento WO 99/03885). El polipéptido E2 de papilomavirus es una proteína nuclear, aunque no se ha identificado ninguna señal de localización nuclear típica. La presentación en la membrana puede conseguirse mediante la fusión del polipéptido E2 con una secuencia secretora (es decir, un péptido de señal) y una secuencia de anclaje a membrana. Dichas secuencias son conocidas en la técnica. Brevemente, las secuencias secretoras se encuentran presentes generalmente en el extremo N-terminal de los polipéptidos presentados en membrana o secretados e inician su paso al interior del retículo endoplasmático (ER). Comprenden 15 a 35 aminoácidos esencialmente hidrofóbicos que seguidamente son eliminados por una endopeptidasa específica localizada en el ER, proporcionando el polipéptido maduro. Las secuencias de anclaje a membrana habitualmente son de naturaleza altamente hidrofóbica y sirven para anclar los polipéptidos a la membrana celular (ver, por ejemplo, Branden y Tooze, en: Introduction to Protein Structure, páginas 202 a 215, NY Garland, 1991).

La elección de las secuencias de anclaje a membrana y/o secretoras que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención es muy amplio. Pueden obtenerse a partir de cualquier polipéptido anclado a membrana y/o secretado (por ejemplo polipéptidos celulares o víricos), tales como la glucoproteína del virus de la rabia, la glucoproteína de cubierta del virus VIH o la proteína F del virus del sarampión, o pueden ser sintéticos. El sitio de inserción preferente de la secuencia secretora es el extremo N-terminal situado cadena abajo del codón de inicio de traducción y el de la secuencia de anclaje a membrana es el extremo C-terminal, por ejemplo inmediatamente cadena arriba del codón de parada. Además, puede utilizarse un péptido conector para unir la secuencia secretora y/o la secuencia de anclaje a membrana al polipéptido E2.

El polipéptido E2 con diana en la membrana codificado por el ácido nucleico comprendido en el vector de la presente invención preferentemente se modifica mediante fusión con las secuencias secretora y de anclaje a membrana de la glucoproteína del virus de la rabia, tal como se ilustra en la sección de ejemplos, adjunta.

Según una forma de realización particularmente preferida, la molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 comprende, consiste esencialmente o consiste alternativamente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n° 2. A título informativo, el polipéptido de SEC ID n° 2 comprende el polipéptido E2 de HPV-16 (entre las posiciones 24 y 387) defectuoso para las actividades de replicación y transactivación (modificaciones del residuo Glu en la posición 61 y del residuo Ile en la posición 95 por residuos de Ala correspondientes a los residuos de Glu e Ile, respectivamente en las posiciones 39 y 73 del polipéptido E2 nativo) fusionado con las secuencias secretora de la glucoproteína (entre las posiciones 2 y 23) y de anclaje a membrana (entre las posiciones 388 y 453) del virus de la rabia.

La presente invención se refiere a un vector o partícula infecciosa que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos dos polipéptidos E2 originados a partir de dos genotipos diferentes de papilomavirus, en los que dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2 no comprenden una porción de 40 o más nucleótidos contiguos que muestran un porcentaje de identidad de 75% o superior entre dos cualesquiera de dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2, y la utilización de dicho vector o partícula infecciosa para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de la infección por papilomavirus, especialmente de la infección persistente por HR-HPV. En una forma de realización ventajosa, "por lo menos dos" es 2, 3 o 4 y cada uno de los polipéptidos E2 codificados se origina a partir de HR-HPV de genotipos diferentes. Independientemente o en combinación, los polipéptidos E2 preferentemente se modifican tal como se ha indicado anteriormente (por ejemplo para que sean defectuosos para la replicación y/o la activación transcripcional y/o la presentación en membrana). Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos dos polipéptidos E2 pueden situarse bajo secuencias reguladoras independientes o pueden fusionarse entre sí para expresarse en una única cadena polipeptídica. Tal como se indica en la presente memoria, entre los ejemplos representativos se incluye un vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificante de polipéptidos E2 de HPV-16 y de HPV-18, así como un vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos E2 de HPV-16, HPV-18, HPV-33 y HPV-52, situados bajo secuencias reguladoras independientes. Las secuencias de nucleótidos codificantes de E2 se degeneran de manera que muestren un porcentaje de homología inferior a 75% entre sí, no comprendiendo dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2 una porción de 40 o más (por ejemplo 50, 55, 59, 70 o incluso más) nucleótidos contiguos que muestren un porcentaje de identidad de 75% o superior a 75% entre dos cualesquiera de dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2.

En una forma de realización específica de la presente invención, el vector o la partícula infecciosa indicados en la presente memoria también puede utilizarse en combinación con uno o más polipéptidos adicionales o con uno o más ácidos nucleicos, vectores o partículas infecciosas codificantes de dicho polipéptido o polipéptidos adicionales. Preferentemente, el polipéptido o polipéptidos adicionales es capaz de intensificar la actividad terapéutica proporcionada por el agente activo anteriormente indicado. El ácido nucleico codificante de dicho polipéptido o polipéptidos adicionales puede insertarse en el vector de la invención o en un vector independiente tal como uno de

los indicados en la presente memoria y su expresión puede situarse bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, tales como las indicadas en la presente memoria. El polipéptido o polipéptidos adicionales pueden ser de origen papilomavirus o de origen no papilomavirus.

- 5 Entre los polipéptidos adicionales no de papilomavirus se incluyen citoquinas (por ejemplo IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, IFN γ) y productos génicos suicidas (por ejemplo la timidina cinasa de HSV-1 indicada en Caruso *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7024-7028, 1993; FCU-1 indicado en el documento WO 99/54481).

- 10 Los polipéptidos adicionales de papilomavirus adicionales comprenden de manera no limitativa cualquier polipéptido temprano de HPV (o fragmento) seleccionado de entre el grupo que consta de E1, E2, E4, E5, E6 y E7 o cualquier mezcla de los mismos.

- 15 En un aspecto de la invención, el polipéptido o polipéptidos adicionales de papilomavirus pueden originarse a partir del mismo genotipo de papilomavirus que el del polipéptido E2 codificado por el vector anteriormente indicado.

- Alternativamente, en otro aspecto de la invención, el polipéptido o polipéptidos adicionales de papilomavirus pueden originarse a partir de un genotipo de papilomavirus diferente que el del polipéptido E2 codificado por el vector anteriormente indicado.

- 20 El polipéptido adicional de papilomavirus puede ser nativo o modificado en comparación con la secuencia nativa correspondiente. Por ejemplo, puede modificarse el polipéptido o polipéptidos adicionales de manera que se reduzca o anule su actividad biológica respectiva (por ejemplo una actividad enzimática) conservando simultáneamente actividad antigénica. Las modificaciones ejemplares ilustradas posteriormente se proporcionan con respecto a los polipéptidos del papilomavirus HPV-16, aunque el experto en la materia podrá trasponer estas mutaciones
25 ejemplares a los polipéptidos correspondientes de otros genotipos de papilomavirus. Además, el polipéptido adicional de papilomavirus puede modificarse adicionalmente de manera que se presente en la membrana celular tal como se ha indicado anteriormente en relación a E2, así como en el documento WO 99/03885.

- 30 Un ejemplo adecuado de polipéptido adicional de papilomavirus es un polipéptido E1 modificado que comprenda una o más mutaciones en comparación con el polipéptido E1 nativo correspondiente, de manera que resulte defectuoso para la estimulación de la replicación vírica. Preferentemente, el polipéptido E1 modificado comprende la mutación de cualquiera de los residuos en las posiciones 412, 439, 482 y/o 496 del polipéptido E1 nativo, tal como las variantes W439R, Y412F, G482D y G496R de E1 de HPV-16 descrito por Yasugi *et al.* (J. Virol. 71:5942-5951, 1997), con especial preferencia para la variante G482D que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido
35 E1 nativo de HPV-16 excepto en la sustitución del residuo Gly en la posición 482 por un residuo Asp (por ejemplo un polipéptido E1 modificado que presenta la secuencia mostrada en SEC ID n° 3). Otra polipéptido E1 modificado ejemplar comprende el polipéptido E1 de HPV-18 con una sustitución del residuo Gly en la posición 489 con un residuo Asp.

- 40 Otro ejemplo adecuado de polipéptidos adicionales de papilomavirus es un polipéptido E6 modificado que no es oncogénico y ha sido alterado para la unión al producto génico celular p53 de supresor tumoral. Todavía otro ejemplo adecuado de polipéptidos adicionales de papilomavirus es un polipéptido E7 modificado que no es oncogénico y que ha sido alterado para la unión al producto génico celular Rb de supresor tumoral. Dichas variantes no oncogénicas se describen en, por ejemplo, Pim *et al.* (Oncogene 9:1869-1876, 1994), Munger *et al.* (EMBO J. 8:4099-4105, 1989), Crook *et al.* (Cell 67:547-556, 1991), Heck *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4442-4446, 1992) y Phelps *et al.* (J. Virol. 66:2148-2427, 1992). Un polipéptido E6 no oncogénico preferido se origina a partir de HPV-16 y presenta la delección de los residuos 118 a 122 (CPEEK) (representando +1 el primer aminoácido del polipéptido E6 de HPV-16 nativo desde el primer residuo Met). Un polipéptido E7 no oncogénico preferido se origina a partir de HPV-16 y presenta una delección de los residuos 21 a 26 (DLYCYE) (representado +1 el primer
50 aminoácido del polipéptido E7 nativo de HPV-16).

- Preferentemente, el polipéptido adicional de papilomavirus para la utilización en la invención, independientemente o en combinación, se selecciona de entre el grupo que consta de los polipéptidos que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos proporcionada en SEC ID n° 3 a 5. Más concretamente, SEC ID n° 3 proporciona la
55 secuencia de aminoácidos de un polipéptido E1 de HPV-16 presentado en membrana defectuoso para la actividad de replicación (G482D). SEC ID n° 4 proporciona la secuencia de aminoácidos de un polipéptido E6 de HPV-16 no oncogénico y presentado en membrana y SEC ID n° 5, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido E7 de HPV-16 no oncogénico y presentado en membrana.

- 60 En el contexto nativo (por ejemplo el genoma de HPV-16 o de HPV-18), el extremo 3' de la molécula de ácidos nucleicos codificante de E1 se solapa en el extremo 5' de la molécula de ácidos nucleicos codificante de E2 a lo largo de 59 nucleótidos. Según una forma de realización preferida, la parte de la molécula de ácidos nucleicos codificante de E1 que se solapa con la molécula de ácidos nucleicos codificante de E2 se modifica de manera que muestre un porcentaje de identidad inferior a 75% con las secuencias de E2 solapantes. Preferentemente, las
65 modificaciones se llevan a cabo en la molécula de ácidos nucleicos codificante de E1 a nivel de los nucleótidos mediante la degeneración del uso de los codones y son silenciosas al nivel de los aminoácidos, es decir, dichas

modificaciones no se traducen en el polipéptido E1 de papilomavirus codificado. Se proporciona en SEC ID nº 6 un ejemplo representativo de las modificaciones que pueden introducirse en la porción de 59 pb presente en el extremo 3' de la molécula de ácidos nucleicos codificante de E1 de HPV-16 y solapante en el contexto nativo con la parte 5' de la molécula de ácidos nucleicos codificante de E2 de HPV-16.

Los vectores preferidos según la invención comprenden un vector seleccionado de entre el grupo que consta de:

- un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16 y que comprende además: (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18,
- un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-33,
- un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18, e (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-52,
- un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-33, e (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-52,
- un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18, (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-33, e (iv) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-52,
- un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E1 de HPV-16, (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18, e (iv) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E1 de HPV-18,
- un vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos E1, E2, E6 y E7 de HPV-16 y de los polipéptidos E1, E2, E6 y E7 de HPV-18.

Preferentemente, el polipéptido o polipéptidos E2 codificados se presentan en membrana y son defectuosos para las actividades de replicación y de activación transcripcional. Preferentemente, el polipéptido E2 de HPV-16 comprende, alternativamente consiste esencialmente o consiste alternativamente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 y/o el polipéptido E2 de HPV-18 comprende, alternativamente consiste esencialmente o consiste alternativamente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 29 y/o el polipéptido E2 de HPV-33 comprende, alternativamente, consiste esencialmente o alternativamente consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 30 y/o el polipéptido E2 de HPV-52 comprende, alternativamente consiste esencialmente o consiste alternativamente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 31.

Independientemente o en combinación, el polipéptido o polipéptidos E1 codificados se presentan en membrana y son defectuosos para la actividad de replicación. Preferentemente, el polipéptido E1 de HPV-16 comprende, alternativamente consiste esencialmente o alternativamente consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 3 y/o el polipéptido E1 de HPV-18 comprende, alternativamente consiste esencialmente o alternativamente consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 32. El polipéptido o polipéptidos E6 y/o E7 codificados se presentan en membrana y son no oncogénicos. Preferentemente, el polipéptido E6 de HPV-16 comprende, alternativamente consiste esencialmente o alternativamente consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, y/o el polipéptido E7 de HPV-16 comprende, alternativamente consiste esencialmente o alternativamente consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 5.

Más preferentemente, la molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-16 comprende, consiste esencialmente o consta de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 8, y/o la molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-18 comprende, consiste esencialmente o consta de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 33 y/o la molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-33 comprende, consiste esencialmente o consta de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 34 o en SEC ID nº 35, y/o la molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-52 comprende, consiste esencialmente o consta de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 36 o en SEC ID nº 37, y/o la molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E1 de HPV-16 comprende, consiste esencialmente o consta de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 7 (secuencias degeneradas para reducir la homología con la parte solapante de E2 de HPV-16) y/o la molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E1 de HPV-18 comprende, consiste esencialmente o consta de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 38 (secuencia degenerada para reducir la homología con las secuencias codificantes de E1 de HPV-16).

Tal como se ha expuesto anteriormente en la presente memoria, las secuencias de nucleótidos codificantes de E2 se encuentran degeneradas, de manera que muestran un porcentaje de homología inferior a 75% entre sí, en donde las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2 no comprenden una parte de 40 o más (por ejemplo 45, 50, 55, 59, 70 o incluso más) nucleótidos contiguos que muestran un porcentaje de identidad de 75% o superior a 75% entre dos cualesquiera de dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2. Las secuencias de nucleótidos anteriormente indicadas completan dicha forma de realización.

La molécula o moléculas de ácidos nucleicos comprendidas en el vector o partícula vírica infecciosa de la presente invención pueden generarse utilizando datos de secuencia accesibles de la técnica y la información de secuencia proporcionada en la presente memoria. Puede aislarse directamente a partir de células que contienen HPV (por ejemplo células CaSKi disponibles de ATCC bajo el número de acceso CRL-1550) o de cualquier fuente de papilomavirus tal como se ha definido anteriormente, mediante técnicas convencionales de biología molecular o PCR y, en caso necesario, puede modificarse adicionalmente tal como se ha definido en la presente memoria mediante técnicas rutinarias de mutagénesis (por ejemplo para optimizar la expresión en una célula huésped particular, para generar una variante defectuosa, etc.). Alternativamente, la molécula o moléculas de ácidos nucleicos comprendidas en el vector de la invención también pueden generarse mediante síntesis química en un procedimiento automatizado (por ejemplo pueden ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes tal como se describe en, por ejemplo, Edge, *Nature* 292:756, 1981; Nambair *et al.*, *Science* 223:1299, 1984; Jay *et al.*, *J. Biol. Chem.* 259:6311, 1984).

En otra forma de realización, la molécula o moléculas de ácidos nucleicos comprendidas en el vector o partícula vírica infecciosa de la presente invención se encuentran en una forma adecuada para la expresión del polipéptido o polipéptidos codificados en una célula u organismo huésped, lo que implica que la molécula o moléculas de ácidos nucleicos se sitúan bajo el control de una o más secuencias reguladoras necesarias para la expresión de las mismas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencias reguladoras" se refiere a cualquier secuencia que permita, contribuya o module la expresión de la molécula de ácidos nucleicos en una célula huésped dada, incluyendo la replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción, estabilidad y/o transporte del ácido nucleico o derivado del mismo (es decir, ARNm) en la célula huésped. Dichas secuencias reguladoras son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, 1990). El experto en la materia apreciará que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como el tipo de vector, la célula huésped, el nivel de expresión deseado, etc. En el contexto de la presente invención, las secuencias reguladoras se encuentran ligadas funcionalmente a la molécula de ácidos nucleicos que debe expresarse. La expresión "operablemente ligado" pretenderse referirse a que la molécula de ácidos nucleicos se encuentra ligada a las secuencias reguladoras de una manera que permite su expresión en una célula u organismo huésped.

El promotor resulta de especial importancia y la presente invención comprende la utilización de promotores constitutivos que dirigen la expresión de la molécula de ácidos nucleicos en muchos tipos de célula huésped y aquellos que dirigen la expresión únicamente en determinadas células huésped o en respuesta a sucesos concretos o factores exógenos (por ejemplo la temperatura, la adición de un nutriente, hormona u otro ligando). Los promotores adecuados han sido muy descritos en la literatura y pueden mencionarse concretamente promotores víricos tales como los promotores del RSV (virus del sarcoma de Rous), del SV40 (virus 40 del simio), del CMV (citomegalovirus) y MLP (promotor tardío mayor). Entre los promotores preferentes para la utilización en un vector poxvirus se incluyen, aunque sin limitación, los promotores de Vaccinia 7.5K, H5R, TK, p28, p11 y K1L, los promotores quiméricos entre promotores poxvíricos tempranos y tardíos, así como promotores sintéticos tales como los indicados en Chakrabarti *et al.* (*Biotechniques* 23:1094-1097, 1997), Hammond *et al.* (*J. Virological Methods* 66:135-138, 1997) y Kumar y Boyle (*Virology* 179:151-158, 1990).

El experto en la materia apreciará que las secuencias reguladoras que controlan la expresión de la molécula de ácidos nucleicos pueden comprender además elementos adicionales para el inicio, regulación y/o terminación correctos de la transcripción (por ejemplo secuencias poliA de terminación de la transcripción), transporte del ARNm (por ejemplo secuencias de señal de localización nuclear), de procesamiento (es decir, señales de corte y empalme), de estabilidad (por ejemplo intrones y secuencias 5' y 3' no codificantes) y de traducción (por ejemplo secuencias líder tripartitas, sitios de unión ribosómica, secuencias de Shine-Dalgarno, etc.) en la célula u organismo huésped.

En el contexto de la presente invención, una o más copias de la molécula de ácidos nucleicos pueden encontrarse comprendidas en dicho vector o partícula vírica infecciosa utilizada según la presente invención.

El término "vector" tal como se utiliza en la presente memoria define vectores víricos así como no víricos (por ejemplo ADN plasmídico), incluyendo vectores extracromosómicos (por ejemplo episomas), vectores multicopia e integrantes (es decir, que se incorporan en los cromosomas del huésped). Resultan particularmente importantes en el contexto de la invención los vectores para la utilización en terapia génica (es decir, que pueden introducir la molécula de ácidos nucleicos en un organismo huésped), así como los vectores de expresión para la utilización en diversos sistemas de expresión. En referencia a un vector vírico, el término "vector" tal como se utiliza en la presente

memoria se refiere a cualquier molécula de ácidos nucleicos que comprende por lo menos un elemento de origen vírico, incluyendo un genoma vírico completo, una parte del mismo o un genoma vírico modificado tal como se indica posteriormente, así como partículas víricas generadas del mismo (por ejemplo un vector vírico empaquetado en una cápside vírica para producir partículas víricas infecciosas).

Entre los vectores no víricos adecuados se incluyen plásmidos tales como pREP4, pCEP4 (Invitrogene), pCI (Promega), pCDM8 (Seed, Nature 329:840, 1987), pVAX y pgWiz (Gene Therapy System Inc., Himoudi *et al.*, J. Virol. 76:12735-12746, 2002).

Los vectores víricos pueden originarse a partir de una diversidad de diferentes virus, y especialmente a partir de un virus seleccionado de entre el grupo que consta de retrovirus, adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), poxvirus, herpesvirus, virus del sarampión y virus espumoso. Los vectores víricos pueden ser competentes para replicación o pueden discapacitarse genéticamente de manera que sean defectuosos en replicación o de replicación alterada. La expresión "competente para replicación" tal como se utiliza en la presente memoria comprende los vectores víricos selectivos para replicación y condicionalmente replicantes que se manipulan para que se repliquen mejor o selectivamente en células huésped específicas (por ejemplo en células tumorales).

En un aspecto, el vector es un vector adenovírico (para una revisión ver "Adenoviral vectors for gene therapy", Editores D. Curiel y J. Douglas, Academic Press, 2002). Puede originarse a partir de una diversidad de fuentes humanas o animales y puede utilizarse cualquier serotipo de los serotipos adenovíricos 1 a 51. Resultan particularmente preferentes los adenovirus humanos 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), 11 (Ad11), 24 (Ad24) y 35 (Ad35). Dichos adenovirus se encuentran disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) y han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, organización y métodos de producción, permitiendo que el experto en la materia realice aplicaciones de los mismos (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.133.028, nº 6.110.735, el documento WO 02/40665, el documento WO 00/50573, el documento EP 1016711; Vogels *et al.*, J. Virol. 77:8263-8271, 2003).

El vector adenovírico puede ser competente para la replicación. Se encuentran fácilmente disponibles para el experto en la materia numerosos ejemplos de vectores adenovíricos competentes para la replicación (Hernández-Alcoceba *et al.*, Human Gene Ther. 11:2009-2024, 2000; Nemunaitis *et al.*, Gene Ther. 8:746-759, 2001; Alemany *et al.*, Nature Biotechnology 18:723-727, 2000). Por ejemplo, pueden construirse a partir de un genoma adenovírico de tipo salvaje mediante delección del dominio CR2 de E1A (por ejemplo, patente WO 00/24408) y/o mediante sustitución de los promotores de E1 y/o E4 nativos por promotores específicos de tejido, tumor o estado celular (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.998.205, el documento WO 99/25860, la patente US nº 5.698.443, el documento WO 00/46355, el documento WO 00/15820 y el documento WO 01/36650).

Alternativamente, el vector adenovírico es defectuoso para la replicación (ver, por ejemplo, el documento WO 94/28152; Lusk *et al.*, J. Virol. 72:2022-2032, 1998). Los vectores adenovíricos defectuosos para replicación preferentes son defectuosos para E1 (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.136.594 y nº 6.013.638), con una delección de E1 que se extiende aproximadamente entre las posiciones 459 y 3.328 o entre aproximadamente las posiciones 459 y 3.510 (haciendo referencia a la secuencia del adenovirus humano de tipo 5 dado a conocer en GeneBank bajo el número de acceso M 73260 y en Chroboczek *et al.*, Virol. 186:280-285, 1992). La capacidad de clonación puede mejorarse adicionalmente mediante delección de la parte o partes adicionales del genoma adenovírico (por ejemplo en la región no esencial de E3 o en otras regiones no esenciales de E2 o E4). La inserción de la molécula de ácidos nucleicos utilizada en la invención puede llevarse a cabo mediante recombinación homóloga en cualquier localización del genoma adenovírico tal como se describe en Chartier *et al.* (J. Virol. 70:4805-4810, 1996). Preferentemente, se inserta en sustitución de la región de E1. Puede situarse en orientación de sentido o antisentido respecto a la dirección natural de transcripción de la región en cuestión.

En otro aspecto preferido, el vector de la invención es un vector poxvirus (ver, por ejemplo, Cox *et al.*, en: "Viruses in Human Gene Therapy", editor J.M. Hos, Carolina Academic Press). Puede obtenerse a partir de cualquier miembro de Poxviridae, en particular del poxvirus del canario (por ejemplo ALVAC, tal como se describe en el documento WO 95/27780), del poxvirus aviar (por ejemplo TROVAC tal como se describe en Paoletti *et al.*, Dev. Biol. Stand. 84:159-163, 1995) o del virus Vaccinia, siendo preferente éste último. Entre los virus Vaccinia adecuados se incluyen, aunque sin limitación, la cepa Copenhagen (Goebel *et al.*, Virol. 179:247-266 y 517-563, 1990; Johnson *et al.*, Virol. 196:381-401, 1993), la cepa Wyeth, NYVAC (ver el documento WO 92/15672 y Tartaglia *et al.*, Virology 188:217-232, 1992) y la cepa Ankara (MVA) modificada altamente atenuada (Mayr *et al.*, Infection 3:6-16, 1975).

La técnica básica para insertar la molécula de ácidos nucleicos y elementos reguladores asociados necesarios para la expresión en un genoma de poxvirus se describe en numerosos documentos accesibles al experto en la materia (Paul *et al.*, Cancer Gene Ther. 9:470-477, 2002; Piccini *et al.*, Methods of Enzymology 153:545-563, 1987; patentes US nº 4.769.330, nº 4.772.848, nº 4.603.112, nº 5.100.587 y nº 5.179.993). Habitualmente, se realiza una recombinación homóloga entre secuencias solapantes (es decir, flanqueantes del sitio de inserción deseado) presentes tanto en el genoma vírico como en un plásmido que porta el ácido nucleico que debe insertarse. La molécula de ácidos nucleicos comprendida en el vector de la invención preferentemente se inserta en un locus no esencial del genoma poxvírico, con el fin de que el poxvirus recombinante siga siendo viable e infeccioso. Las

regiones no esenciales son regiones intergénicas no codificantes o cualquier gen para el que la inactivación o delección no altere significativamente el crecimiento, replicación o infección víricos. También puede contemplarse la inserción en un locus vírico esencial, con la condición de que la función defectuosa se proporcione en trans durante la producción de las partículas víricas, por ejemplo mediante la utilización de una línea celular ayudante que porte las secuencias complementarias correspondientes a las delecionadas en el genoma poxvírico.

Al utilizar el virus Vaccinia Copenhagen, la molécula de ácidos nucleicos preferentemente se inserta en el gen timidina cinasa (tk) (Hruby *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3411-3415, 1983; Weir *et al.*, J. Virol. 46:530-537, 1983). Sin embargo, también resultan apropiados otros sitios de inserción, por ejemplo en el gen hemaglutinina (Guo *et al.*, J. Virol. 63:4189-4198, 1989), en el locus K1L, en el gen u (Zhou *et al.*, J. Gen. Virol. 71:2185-2190, 1990) o en el extremo izquierdo del genoma del virus Vaccinia, en donde una diversidad de delecciones espontáneas o artificiales han sido publicadas en la literatura (Altenburger *et al.*, Archives Virol. 105:15-27, 1989; Moss *et al.*, J. Virol. 40:387-395, 1981; Panicali *et al.*, J. Virol. 37:1000-1010, 1981; Perkus *et al.*, J. Virol. 63:3829-3836, 1989; Perkus *et al.*, Virol. 179:276-286, 1990; Perkus *et al.*, Virol. 180:406-410, 1991).

Al utilizar el MVA, la molécula de ácidos nucleicos puede insertarse en cualquiera de las delecciones I a VII identificadas presentes en el genoma del MVA (Antoine *et al.*, Virology 244:365-396, 1998), así como en el locus D4R, aunque resulta preferida la inserción en la delección II o III (Meyer *et al.*, J. Gen. Virol. 72:1031-1038, 1991; Sutter *et al.*, Vaccine 12:1032-1040, 1994).

Al utilizar el poxvirus aviar, aunque puede considerarse la inserción dentro del gen timidina cinasa, la molécula de ácidos nucleicos preferentemente se introduce en la región intergénica situada entre las ORF 7 y 9 (ver, por ejemplo, el documento EP 314 569 y la patente US nº 5.180.675).

Preferentemente, el vector de la invención es un vector virus Vaccinia, con especial preferencia por un vector MVA. Más preferentemente, la molécula o moléculas de ácidos nucleicos se insertan en la delección III y, finalmente, en dirección opuesta, especialmente en el caso de que dichas moléculas de ácidos nucleicos se sitúen bajo el control del mismo promotor. Resulta preferente que la molécula o moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2 y/o E7 se sitúen bajo el promotor H5R de Vaccinia y la molécula o moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E1 y/o E6 bajo el control del promotor de p7.5K.

La presente descripción también da a conocer la utilización de un vector acompañado con lípidos o polímeros formando estructuras particuladas, tales como liposomas, lipoplejos o nanopartículas. Dichas tecnologías se encuentran disponibles de la técnica (ver, por ejemplo, Arangoa *et al.*, Gene Ther. 10:5-14, 2003; Eliaz *et al.*, Gene Ther. 9:1230-1237, 2002, y Betageri *et al.*, "Liposome drug delivery systems", Technomic Publishing Company, Inc., 1993).

La presente invención también se refiere a partículas víricas infecciosas que comprenden los vectores anteriormente indicados y su utilización tal como se define en la presente memoria.

Típicamente, dichas partículas víricas se producen en una línea celular apropiada cultivada bajo condiciones adecuadas y utilizando procedimientos bien conocidos de la técnica. En la presente memoria no se realiza ningún intento para describir en detalle los diversos métodos conocidos para la producción de partículas víricas infecciosas.

En el caso de que el vector vírico sea defectuoso, las partículas infecciosas habitualmente se producen en una línea celular de complementación o mediante la utilización de un virus ayudante, que proporciona en trans los genes víricos no funcionales. Por ejemplo, entre las líneas celulares adecuadas para la complementación de los vectores adenovíricos con delección de E1 se incluyen las células 293 (Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1997), así como las células PER-C6 (Fallaux *et al.*, Human Gene Ther. 9:1909-1917, 1998) y los derivados de PER-C6. Las células apropiadas para propagar los vectores poxvirus son células aviares, y más preferentemente fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF) preparados a partir de embriones de pollo obtenidos de huevos fertilizados. Las células productoras pueden cultivarse en biorreactores de fermentación, matraces y placas Petri convencionales, bajo condiciones apropiadas de temperatura, pH y contenido de oxígeno.

Las partículas víricas infecciosas pueden recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo o de las células tras la lisis. Pueden purificarse adicionalmente según técnicas estándares (cromatografía, ultracentrifugación tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 96/27677, 98/00524, 98/22588, 98/26048, 00/40702, EP 1016700 y WO 00/50573).

La presente descripción también da a conocer la utilización de vectores o partículas víricas que han sido modificadas para permitir el direccionamiento preferente a una célula diana particular (ver, por ejemplo, Wickam *et al.*, J. Virol. 71:8221-8229, 1997; Arnberg *et al.*, Virol. 227:239-244, 1997; Michael *et al.*, Gene Therapy 2:660-668, 1995; patentes WO 94/10323, WO 02/96939 y patente EP 1 146 125). Una particularidad característica de los vectores y partículas víricas direccionados es la presencia en su superficie de un ligando capaz de reconocer y unirse a un componente celular y expuesto en la superficie, tal como un marcador específico de un tipo de célula (por ejemplo una célula infectada por HPV), un marcador específico de tejido (por ejemplo un marcador específico de células

epiteliales), así como un antígeno vírico (por ejemplo HPV). Entre los ejemplos de ligandos adecuados se incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos a un dominio antigénico de HPV. El direccionamiento celular puede llevarse a cabo insertando genéticamente el ligando en un polipéptido presente sobre la superficie del virus (por ejemplo fibra adenovírica, pentona, pIX o producto del gen *p14* de Vaccinia).

También se describen células huésped que comprenden los vectores o partículas víricas infecciosas anteriormente indicados para la utilización según se define en la presente memoria.

Los vectores y partículas víricas infecciosas de la invención pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquier método conocido de la técnica. Entre dichos métodos se incluyen, aunque sin limitación, la microinyección (Capechi *et al.*, Cell 22:479-488, 1980), la transfección mediada por CaPO_4 (Chen y Okayama, Mol. Cell Biol. 7:2745-2752, 1987), la transfección mediada por DEAE-dextrano, la electroporación (Chu *et al.*, Nucleic Acid Res. 15:1311-1326, 1987), la lipofección/fusión de liposomas (Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1987), el bombardeo con partículas (Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9568-9572, 1990), las pistolas génicas, la transducción, la infección vírica, así como la administración directa en un organismo huésped por diversos medios. Además, tal como se comenta anteriormente, pueden utilizarse asociados a reactivos de transfección con el fin de facilitar su introducción en la célula u organismo huésped, tal como polímeros policationicos (por ejemplo quitosano, polimetacrilato, PEI, etc.) y lípidos catiónicos (por ejemplo DC-Chol/DOPE, lipofectina y transfectam, ahora disponible de Promega).

En otro aspecto de la presente invención, el vector o partícula vírica infecciosa anteriormente indicado (también denominado en la presente memoria "agente activo") o cualquier combinación de los mismos se encuentra comprendido en una composición.

Ventajosamente, la composición es una composición farmacéutica que comprende, además de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente o agentes activos, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una dosis suficiente para el alivio de uno o más síntomas normalmente asociados a la enfermedad o condición que se desea tratar. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva podría ser aquella cantidad necesaria para inducir una respuesta inmunológica o para activar el sistema inmunológico, resultando en el desarrollo de una respuesta anti-HPV. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir alguno o todos los portadores, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

Preferentemente, la composición de la invención se formula para la utilización humana o animal. Preferentemente se incluye en un diluyente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y presenta una fuerza iónica relativamente baja. Entre los ejemplos representativos de diluyentes adecuados se incluyen agua estéril, solución salina fisiológica (por ejemplo cloruro sódico), solución de Ringer, soluciones de glucosa, trehalosa o sacarosa, solución de Hank y otras soluciones acuosas salinas fisiológicamente equilibradas (ver, por ejemplo, la edición más actual de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins). Además, la composición puede tamponarse a un pH fisiológico o ligeramente básico (por ejemplo entre aproximadamente pH 7 y aproximadamente pH 9). Entre los tampones adecuados, aunque sin limitación, se incluyen el tampón fosfato (por ejemplo PBS), el tampón bicarbonato y el tampón Tris-HCl. A título ilustrativo, entre las formulaciones particularmente adaptadas a la invención se incluyen:

- o sacarosa 1 M, NaCl 150 mM, MgCl_2 1 mM, Tween-80 54 mg/l, Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 (especialmente en el caso de que el agente activo sea un vector adenovírico),
- o manitol 10 mg/ml, HSA 1 mg/ml, Trips 20 mM, pH 7,2 y NaCl 150 mM, y
- o solución salina fisiológica.

Dichas formulaciones resultan particularmente adecuadas para conservar la estabilidad de la composición a la temperatura de congelación (por ejemplo -70°C o -20°C), de refrigeración (por ejemplo 4°C) o a temperatura ambiente. La composición de la invención también puede formularse en forma sólida. Pueden obtenerse composiciones sólidas (por ejemplo en forma de polvos secos o liofilizadas) mediante un procedimiento que implica el secado al vacío y la liofilización. Habitualmente se reconstituyen en un vehículo adecuado antes de utilizarlas.

La composición también puede contener uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables, incluyendo, por ejemplo, la modificación o mantenimiento de pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución de la formulación, la modificación o mantenimiento de la liberación o absorción en un organismo animal o humano, la inducción del transporte a través de una barrera mucosal o la penetración en un órgano particular. Por ejemplo, una composición adecuada para la administración vaginal puede incluir finalmente uno o más potenciadores de la absorción que resulten útiles para incrementar el tamaño de poro de las membranas mucosales.

Además, la composición de la invención puede comprender uno o más adyuvantes adecuados para la aplicación sistémica o mucosal en el ser humano. Preferentemente, el adyuvante puede estimular la inmunidad frente al agente activo, especialmente inmunidad mediada por células T, por ejemplo a través de receptores de tipo Toll (TLR), tales como TLR-7, TLR-8 y TLR-9. Entre los ejemplos representativos de adyuvantes útiles se incluyen, aunque sin limitación, alumbre, emulsión de aciete mineral tal como las soluciones completa e incompleta de Freund (IFA), lipopolisacáridos o un derivado de los mismos (Ribi *et al.*, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, páginas 407 a 419, 1986), saponinas tales como QS21 (Sumino *et al.*, J. Virol. 72:4931-4939, 1998; patente WO 98/56415), compuestos de imidazoquinolina tales como imiquimod (Suader, J. Am. Acad. Dermatol. 43:S6-S11, 2000), derivado 1H-imidazo(4,5-c)quinolón-4-amina (AldaraTM) y el compuesto relacionado S-27609 (Smorlesi, Gene Ther. 12:1324-1332, 2005), oligodesoxinucleótidos citosina fosfato guanosina, tales como CpG (Chu *et al.*, J. Exp. Med. 186:1623, 1997; Tritel *et al.*, J. Immunol. 171:2358-2547, 2003) y péptidos catiónicos tales como IC-31 (Kritsch *et al.*, J. Chromatogr. Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 822:263-270, 2005).

La composición de la invención puede administrarse mediante una diversidad de modos de administración, entre ellos la administración sistémica, tópica y mucosal. La administración sistémica puede llevarse a cabo por cualquier medio, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intravascular o intraarterial. Las inyecciones pueden llevarse a cabo con jeringas y agujas convencionales, o mediante cualquier dispositivo apropiado disponible de la técnica. La administración mucosal puede llevarse a cabo por vía oral, nasal, intratraqueal, intrapulmonar, intravaginal o intrarrectal. La administración tópica puede llevarse a cabo utilizando medios transdérmicos (por ejemplo parches y similares). La composición de la invención preferentemente se formula en una forma adecuada para la inyección, resultando preferente la administración intramuscular o subcutánea.

La dosis apropiada puede adaptarse como función de diversos parámetros, en particular el modo de administración, el agente activo utilizado, la edad, salud y peso del organismo huésped, el tipo de tratamiento concurrente y/o la frecuencia del tratamiento. El experto en la materia podrá realizar rutinariamente afinar adicionalmente los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento a la luz de las circunstancias relevantes. Para una guía general, la dosis adecuada para las partículas adenovíricas varía entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{13} iu (unidades infecciosas), preferentemente entre aproximadamente 10^7 y aproximadamente 10^{12} iu, y preferentemente entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{11} iu. La dosis adecuada para las partículas de MVA varía entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{10} pfu (partícula formadora de placa), preferentemente entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^9 pfu, y preferentemente entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^8 pfu. Los vectores plásmidos pueden administrarse en dosis de entre 10 µg y 20 mg, y preferentemente de entre 100 µg y 2 mg.

Además, la administración puede tener lugar en una única dosis o, alternativamente, en dosis múltiples según los protocolos estándares, dosis y regímenes durante varias horas, días y/o semanas. Además, la administración puede realizarse mediante inyección de bolo o la infusión continua. Por ejemplo, el organismo huésped puede tratarse con por lo menos dos (por ejemplo entre 2 y 10) administraciones de la molécula de ácidos nucleicos, vector, partícula infecciosa o composición anteriormente indicado. Preferentemente, se lleva a cabo una primera serie de administraciones secuencialmente dentro de un periodo de tiempo de entre unos cuantos días y 4 semanas, seguido de una segunda serie de administraciones (por ejemplo una o dos administraciones) llevada a cabo uno a 6 meses después de la última administración de la primera serie. El periodo de tiempo entre cada administración de la segunda serie puede ser de entre unos cuantos días y 4 semanas. En una forma de realización preferida, la primera serie de administraciones comprende tres administraciones secuenciales a intervalos de una semana y la segunda serie comprende una administración 4 a 6 meses después de la primera serie. A modo de guía general, en el caso de que se utilicen partículas infecciosas de MVA según la presente invención, la administración preferentemente se lleva a cabo por vía subcutánea con una dosis de partículas de MVA comprendida entre 10^6 y 5×10^8 pfu.

Tal como se ha indicado anteriormente, el vector, partícula vírica infecciosa o composición indicado en la presente memoria, o combinación de los mismos, preferentemente se administra tras la exposición del organismo huésped (el paciente) a por lo menos un papilomavirus y antes de la detección/aparición de una lesión asociada a un papilomavirus. En otros términos, los organismos huésped con infección por HPV pero que todavía no han progresado a neoplasia son candidatos adecuados para la utilización según la presente invención para prevenir o reducir la probabilidad de progresión a neoplasia y en última instancia a cáncer.

El término "exposición" se refiere al contacto de un organismo huésped con por lo menos un papilomavirus que permite que se produzca la infección. Ahora se encuentran disponibles en la técnica varios métodos diagnósticos, permitiendo diagnosticar la infección por papilomavirus. Por ejemplo, puede recogerse una muestra biológica de un organismo huésped bajo riesgo de infección por papilomavirus y analizarse para la presencia de papilomavirus, ácidos nucleicos víricos (por ejemplo ADN o ARNm) y/o antígenos víricos. Entre dichos métodos se incluyen, aunque sin limitación, PCR, hibridación *in situ*, inmunofluorescencia, ELISA y varios ensayos diagnósticos ahora disponibles. Entre los ejemplos representativos de ensayo adecuados se incluyen el sistema LiPA (patente WO 99/14377; productos de Labo Biomedical, Países Bajos), el ensayo Hybrid Capture II[®] (HCII, Digene Corp., USA, que permite la detección de ADN de 13 HR-HPV), el ensayo Linear Array[®] (Roche, que permite el genotipado del ADN de 37 genotipos de HPV), el sistema Thin Prep (Cytoc Corporation, Marlborough, MA), PreTect-HPV Proofer[®]

(NorChip AS, Noruega, que permite la detección de ARNm de E6/E7 para HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 y HPV-45), los sistemas de PCR/RT-PCR y la PCR en tiempo real descrita en Pretet *et al.* (J. Clin. Virol. 31:140-147, 2004) o en Monnier-Benoit *et al.* (J. Clin. Virol. 31:140-147, 2006). Los cebadores adecuados son conocidos por el experto en la materia o pueden sintetizarse fácilmente basándose en la secuencia de nucleótidos del papilomavirus detectado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "lesión asociada a papilomavirus" se refiere a cualquier enfermedad o condición causada por la infección por un papilomavirus. Esta expresión comprende lesiones premalignas, así como malignas. Entre los ejemplos representativos de lesiones premalignas se incluyen, aunque sin limitación, la neoplasia intraepitelial de grado bajo, moderado o alto que puede detectarse en diversos tejidos, tales como la CIN, la neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) y la neoplasia intraepitelial (AIN), la neoplasia intraepitelial peneana (PIN) y la neoplasia intraepitelial vaginal (VaIN). Entre los ejemplos representativos de lesiones malignas se incluyen, aunque sin limitación, el carcinoma cervical, el carcinoma anal, el cáncer vaginal, el cáncer peneano y el cáncer oral. Las lesiones premalignas y malignas asociadas a papilomavirus pueden visualizarse mediante examen directo (por ejemplo mediante colposcopia, finalmente tras la aplicación de ácido acético) o diagnosticarse con métodos utilizados comúnmente por el médico clínico (por ejemplo el cribado por análisis citológico Papanicolaou o la detección de células anormales de muestras citológicas). Por ejemplo, puede realizarse una biopsia local de regiones o lesiones acidófilas que se visualicen mediante colposcopia y examinarse para anomalías morfológicas (por ejemplo hiperplasia epitelial, anomalías nucleares marcadas, etc.). En el contexto de la invención, las lesiones asociadas papilomavirus no comprenden anomalías leves tales como ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado).

Según una forma de realización preferida, el vector o partícula vírica infecciosa descrito en la presente memoria, o composición o combinación de los mismos se utiliza para tratar una infección persistente causada por como mínimo un papiloma, especialmente un HR-HPV, con especial preferencia por HPV-16, HPV-18, HPV-33 o HPV-52 o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo tanto HPV-16 como HPV-18). En el contexto de la invención, los polipéptidos E2 codificados en el vector según la invención pueden originarse a partir del papilomavirus infeccioso o de un papilomavirus que reaccione cruzadamente con el papilomavirus infeccioso.

Debido a la conservación de las secuencias de aminoácidos en los polipéptidos E2 de diversos HR-HPV, podría esperarse reactividad cruzada entre HPV16 y HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 y HPV58. En un aspecto, la presente invención utiliza un vector, partícula vírica infecciosa o composición según la invención tal como se describe en la presente memoria codificante de un polipéptido E2 originado a partir de HPV-16, para el tratamiento de pacientes que sufren una infección causada por como mínimo uno de entre HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 y HPV58.

De manera similar, puede esperarse una reactividad cruzada entre HPV-18 y HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70 y HPV-85. En otro aspecto, la presente invención utiliza una molécula de ácidos nucleicos, vector, partícula vírica infecciosa o composición codificante de un polipéptido E2 que se origina a partir de HPV-18, para el tratamiento de pacientes que sufren una infección causada por como mínimo uno de entre HPV-18, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70 y HPV-85.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "infección persistente por papilomavirus" corresponde a la etapa asintomática de la infección por papilomavirus en un organismo huésped que no ha conseguido una erradicación vírica espontánea tras la exposición al papilomavirus. Se ha establecido una infección persistente por papilomavirus en el caso de que se detecte papilomavirus, o por lo menos uno de sus elementos (por ejemplo ácidos nucleicos, antígenos y similares) en el organismo huésped en 2 ensayos sucesivos separados por varios meses, por ejemplo por lo menos 6 meses, ventajosamente por lo menos 8 meses, preferentemente por lo menos 10 meses, y más preferentemente por lo menos 12 meses, mientras que no se observan indicios clínicos (por ejemplo lesiones premalignas y/o malignas asociadas a papilomavirus). La etapa asintomática se caracteriza por una citología normal (aunque se toleran anomalías leves tales como ASCUS). Por ejemplo, se ha establecido una infección persistente por papilomavirus en pacientes que muestran un ensayo positivo de HCII a intervalos de aproximadamente 6 meses aunque presentan una citología Papanicolaou normal.

En una forma de realización, el vector, partícula vírica infecciosa o composición anteriormente indicado se utiliza según las modalidades indicadas en la presente memoria para inducir o activar una respuesta inmunológica en el organismo huésped tratado en comparación con la no utilización de dichos agentes activos.

La respuesta inmunológica inducida o actividad puede ser específica y/o no específica, y puede ser humoral y/o mediada por células. Entre las respuestas humorales se incluyen la producción de anticuerpos contra por lo menos un polipéptido de papilomavirus, mientras que la respuesta celular incluye una respuesta de células T ayudantes y/o de CTL y/o la estimulación de la producción de citoquinas. Preferentemente, la respuesta inmunológica inducida o actividad resulta efectiva para proporcionar una respuesta antivírica contra por lo menos uno de los papilomavirus infecciosos.

La capacidad del vector, partícula vírica infecciosa o composición anteriormente indicado para inducir o activar una respuesta inmunológica en un organismo huésped tratado puede evaluarse *in vitro* o *in vivo* mediante una diversidad

de ensayos que son estándares de la técnica (para una descripción general de las técnicas disponibles para evaluar la inducción y activación de una respuesta inmunológica, ver, por ejemplo, Coligan *et al.*, 1992 y 1994, *Current Protocols in Immunology*, editado por J. Wiley & Sons Inc., National Institute of Health). La medición de la inmunidad celular puede llevarse a cabo mediante la medición de perfiles de citoquinas secretadas por células efectoras activadas, incluyendo aquéllas derivadas de célula T CD4+ y CD8+ (por ejemplo la cuantificación de células productoras de IL-10 o de IFN γ mediante ELISPOT), mediante la determinación del estado de activación de las células efectoras inmunológicas (por ejemplo ensayos de proliferación de las células T mediante una incorporación clásica de [3 H]timidina), mediante el ensayo para linfocitos T específicos de antígeno en un sujeto sensibilizado (por ejemplo la lisis específica de péptidos en un ensayo de citotoxicidad). La capacidad de estimular una respuesta celular también podría evaluarse, por ejemplo, en ratones singénicos (por ejemplo H $_2$ D b) o en ratones transgénicos (por ejemplo HLA A2 y HLA B7) mediante ELISPOT, técnicas analíticas basadas en tetrámeros u otras técnicas estándares para el análisis de la inmunidad mediada por células T. La respuesta humoral puede determinarse mediante ensayos de unión de anticuerpos y/o de competición (ver, por ejemplo, Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, 1989). Por ejemplo, pueden desarrollarse herramientas inmunológicas, por ejemplo ELISA, para detectar anticuerpos anti-E2 en el organismo huésped tratado.

En otra forma de realización, el vector, partícula vírica infecciosa o composición anteriormente indicado se utiliza según las modalidades indicadas en la presente memoria, para proporcionar una respuesta antivírica contra por lo menos uno de los papilomavirus infecciosos en comparación con la no utilización de dichos agentes activos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "respuesta antivírica" se refiere a una reducción o eliminación de síntomas habitualmente asociada a una infección por papilomavirus en el organismo tratado. Por ejemplo, puede determinarse una respuesta antivírica a partir de la capacidad del agente o agentes activos anteriormente indicados para controlar la infección vírica, reducir o eliminar por lo menos el papilomavirus infeccioso y/o de reducir o eliminar las células infectadas o aquéllas que expresan secuencias génicas de papilomavirus (especialmente los genes E6 y E7 potencialmente oncogénicos). Lo anterior puede evaluarse como una reducción significativa o la falta de un nivel detectable de marcadores indicados de infección por papilomavirus, por ejemplo papilomavirus, ácidos nucleicos víricos y/o antígenos víricos, en una muestra biológica recogida del organismo huésped bajo tratamiento, en comparación con la situación anterior a la utilización. La reducción o eliminación se indica comparando el nivel de dicho marcador o marcadores medidos en el punto temporal posterior al cese de la utilización según la invención, con el nivel del mismo marcador o marcadores medido antes de dicha utilización, que representa la infección no tratada. En una forma de realización preferida, la respuesta antivírica permite que no haya papilomavirus, ácidos nucleicos víricos y/o antígenos detectables medidos en una muestra biológica recogida del organismo huésped bajo tratamiento durante varios meses después de cesar la utilización según la invención.

También puede determinarse una respuesta antivírica a partir de la capacidad del agente o agentes activos anteriormente indicados de reducir significativamente la incidencia, el tamaño y/o la severidad de las lesiones que típicamente se desarrollan en los organismos infectados por papilomavirus. Tal como se utiliza en la presente memoria, "reducir" se refiere a prevenir, retrasar, alterar, lentificar, retardar y/o posponer el desarrollo de la incidencia, el tamaño y/o la severidad de las lesiones asociadas a papilomavirus tal como se define en la presente memoria. La capacidad del agente activo anteriormente activo de reducir la incidencia, el tamaño y/o la severidad de las lesiones asociadas a papilomavirus puede evaluarse mediante un seguimiento periódico del organismo huésped tratado. Preferentemente, la reducción es suficiente para que el organismo huésped tratado no desarrolle ninguna lesión asociada a papilomavirus (por ejemplo lesiones CIN confirmadas histológicamente) durante por lo menos un año, ventajosamente durante por lo menos 2 años, preferentemente durante por lo menos 3 años, y más preferentemente durante por lo menos 5 años, tras completar la utilización según la invención. Más preferentemente, la utilización según la invención permite retrasar o eliminar la necesidad de un procedimiento ablativo (por ejemplo la conización) en el organismo huésped tratado.

A modo de indicación general, el periodo de tiempo que separa la última administración del agente activo en el organismo huésped y la detección de la respuesta antivírica puede variar dependiendo de la historia de la infección por papilomavirus, las modalidades de utilización y/o el organismo huésped bajo tratamiento. Preferentemente, es una cuestión de tres meses a varios años, con especial preferentemente durante por lo menos 3 meses, ventajosamente por lo menos 4 meses, preferentemente por lo menos 5 meses, preferentemente por lo menos 6 meses, y más preferentemente por lo menos un año. Por ejemplo, se determina una respuesta antivírica en el caso de que se detecte que el organismo huésped que era positivo antes del tratamiento para ADN del HPV detectado en una muestra cervical, por ejemplo, mediante Digen HC-II, es negativo para el mismo papilomavirus por lo menos 6 meses después de la última administración del agente activo anteriormente indicado.

En una forma de realización, la utilización según la presente invención puede llevarse a cabo conjuntamente con una o más modalidades terapéuticas convencionales. Una multiplicidad de enfoques terapéuticos proporcionan al organismo huésped una intervención de base más amplia. La administración de los mismos puede ser anterior, concomitante o posterior a la administración del vector, partícula vírica infecciosa o composición utilizado en la invención.

En otra forma de realización, la utilización según la invención puede llevarse a cabo según una modalidad

terapéutica de primera dosis-refuerzo que comprende la administración secuencial de uno o más dosis iniciales y uno o más refuerzos. Típicamente, la primera dosis y la dosis de refuerzo utilizando vehículos diferentes que comprenden o codifican por lo menos un dominio inmunogénico común. La dosis inicial se administra inicialmente en el organismo huésped y la dosis de refuerzo se administra posteriormente en el mismo organismo huésped tras un periodo variable de entre un día y doce meses. La utilización según la invención puede comprender una a diez administraciones secuenciales de la dosis inicial seguido de una a diez administraciones secuenciales de la dosis de refuerzo. Además, la dosis inicial y la dosis de refuerzo pueden administrarse en el mismo sitio o en sitios alternativos por la misma vía o por vías de administración diferentes, por ejemplo la inyección subcutánea de un vector de MVA, la inyección intramuscular para un plásmido de ADN y para un vector adenovírico.

En el contexto de la invención, el vector, partícula vírica infecciosa o composición anteriormente indicados pueden utilizarse para iniciar o reforzar o tanto iniciar como reforzar una respuesta inmunológica anti-papilomavirus. Por ejemplo, el vector o partículas de adenovirus tal como se ha definido anteriormente pueden utilizarse como dosis inicial y vector o partículas de MVA tal como se ha definido anteriormente como refuerzo, o viceversa. También resulta posible utilizar el vector, partícula vírica infecciosa o composición anteriormente indicado en combinación con cualquier material de la técnica anterior codificante o que comprende un dominio antigénico en común con la composición de la invención. La fuente de dicho material es amplia e incluye, aunque sin limitación, péptidos, proteínas (por ejemplo un polipéptido E2 producido recombinantemente), vectores víricos, ADN plasmídico, partículas proteicas tales como partículas de tipo vírico, materiales celulares tales como células irradiadas, etc.

La invención se ha descrito a título ilustrativo, y debe interpretarse que la terminología que se ha utilizado pretende utilizarse a título descriptivo y no limitativo. Evidentemente podrán introducirse muchas modificaciones y variaciones en la presente invención a partir de las enseñanzas proporcionadas anteriormente. Por lo tanto, debe interpretarse que, dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de un modo diferente del descrito concretamente en la presente memoria.

Leyendas de las figuras

La figura 1 ilustra una representación esquemática del plásmido pTG17408 codificante de un polipéptido E2 de HPV-16 defectuoso y presentado sobre membrana.

La figura 2 ilustra una representación esquemática del plásmido pTG17409 codificante de un polipéptido E1 de HPV-16 defectuoso para replicación y presentando en membrana, la secuencia de nucleótidos del cual se ha degenerado en la parte de 59 nucleótidos común a la secuencia codificante de E2 de HPV-16.

La figura 3 ilustra la respuesta de Th1 de IFN γ específica de E2 detectada mediante ELISPOT en ratones que han recibido una inyección de MVATG17408 (MVA-E2) o de MVA-N33 de control negativo.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo de la presente invención.

Ejemplos

Los constructos indicados a continuación se prepararon según las técnicas generales de ingeniería genética y de clonación molecular detalladas en Maniatis *et al.* (Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 1989) o según las recomendaciones del fabricante al utilizar un kit comercial. Las técnicas de amplificación por PCR son conocidas por el experto en la materia (ver, por ejemplo, PCR protocols - A guide to methods and applications, publicado por Innis, Gelfand, Sninsky y White, Academic Press, 1990). Los plásmidos recombinantes que portaban el gen de resistencia a la ampicilina se replicaron en *E. coli* C600 (Stratagene), BJ5183 (Hanahan, J. Mol. Biol. 166:557-580, 1983) y NM522 en agar o medio líquido suplementado con 100 μ g/ml de antibiótico. La cepa BJ5183 preferentemente se utiliza en el caso de que la clonación se lleve a cabo mediante recombinación homóloga (Bubek *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:3601-3602, 1993).

Los constructos de los virus Vaccinia recombinantes se preparan según tecnología convencional en el campo, descrita en los documentos indicados anteriormente y en Mackett *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415-7419, 1982) y en Mackett *et al.* (J. Virol. 49:857-864, 1984). El gen de selección *gpt* (xantina guanina fosforribosiltransferasa) de *E. coli* (Falkner y Moss, J. Virol. 62:1849-1854, 1988) se utiliza para facilitar la selección de los virus Vaccinia recombinantes.

Ejemplo 1: Construcción de un vector MVA recombinante que expresa el gen E2 de HPV-16

Clonación del gen E2 de HPV16

Las secuencias de nucleótidos codificantes de E2 de HPV16 se clonaron a partir del ADN genómico aislado de células CaSki (ATCC nº CRL-1550). El gen E2 se amplificó utilizando los cebadores OTG16809 (SEC ID nº 9) y OTG16810 (SEC ID nº 10). El fragmento resultante se digirió con BamHI y EcoRI y se insertó en pGEX2T (Amersham Biosciences) cortado con los mismos enzimas, dando lugar a pTG172329. La secuenciación del gen E2

clonado mostró cinco mutaciones en comparación con la secuencia del prototipo E2 de HPV16 (descrito en GenBank n° NC-01526). Dos mutaciones eran silenciosas y las tres mutaciones no silenciosas (T210I, S219P y K310T) se corrigieron utilizando el kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Stratagene), dando lugar a pTG17268.

Modificación del polipéptido E2 de HPV-16

Las secuencias de nucleótidos de E2 incorporadas en pTG17268 se modificaron mediante mutagénesis sitio-dirigida con el fin de generar una variante de E2 de HPV-16 (E39A y 173A) denominada E2*. Más concretamente, se anuló la función de replicación de E2 mediante la sustitución del residuo Glu en posición 39 con una Ala y la función de transactivación mediante la sustitución del residuo Ile en posición 73 por una Ala. El plásmido resultante pTG17318 comprende las secuencias modificadas codificantes de E2* de HPV-16.

Se modificó adicionalmente E2* de HPV-16 mediante fusión en su extremo N-terminal con un péptido de señal y en su extremo C-terminal con secuencias de anclaje a membrana derivadas de la glucoproteína del aislado de virus de la rabia (GenBank n° ay009097), de manera que se dirigiese la presentación de E2* de HPV-16 en las células huésped expresantes a la superficie de la membrana plasmática. Las secuencias de nucleótidos (SEC ID n° 8) codificantes de la variante defectuosa de E2 presentada en membrana denominada SS-E2*-TMR se reensamblaron mediante triple PCR utilizando los cebadores siguientes: OTG17500 (SEC ID n° 11), OTG17501 (SEC ID n° 12), OTG17502 (SEC ID n° 13), OTG17503 (SEC ID n° 14), OTG17504 (SEC ID n° 15) y OTG17505 (SEC ID n° 16). La secuencia reensamblada se insertó en un vector derivado de pBS (Stratagene), proporcionando pTG17360, y después se clonó en un plásmido de transferencia Vaccinia cadena abajo del promotor de pH5R (Rosel *et al.*, J. Virol. 60:436-449, 1986), resultando en pTG17408 (figura 1).

El plásmido de transferencia se diseñó para permitir la inserción de la secuencia de nucleótidos que debía transferirse mediante recombinación homóloga en la delección III del genoma de MVA. Se origina a partir del plásmido pTG1E (descrito en Braun *et al.*, Gene Ther. 7:1447-1467, 2000), en el que se clonaron las secuencias flanqueantes (BRG3 y BRD3) circundantes a la delección III del MVA, las secuencias del cual se obtuvieron mediante PCR a partir del ADN de MVATGN33.1 (Sutter y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847-10851, 1992). El plásmido de transferencia también contenía una fusión entre la proteína fluorescente verde incrementada de *Aequorea victoria* (gen *eGFP*, aislado a partir de pEGP-C1, Clontech) y el gen xantina-guanina fosforibosiltransferasa de *Escherichia coli* (gen *gpt*) bajo el control del promotor sintético temprano-tardío del virus Vaccinia p11K7.5 (cortesía de R. Wittek, Universidad de Lausanne). La síntesis de xantina-guanina fosforibosiltransferasa permite que el MVA recombinante GPT⁺ forme placas en un medio selectivo que contiene ácido micofenólico, xantina e hipoxantina (Falkner *et al.*, J. Virol. 62:1849-1854, 1988) y eGFP permite la visualización de las placas de MVA recombinantes. El marcador de selección eGFP-GPT se sitúa entre dos secuencias homólogas en la misma orientación. Tras conseguir la selección clonal, el marcador de selección se elimina fácilmente mediante varios pases sin selección, permitiendo el crecimiento de MVA recombinante *eGFP-GPT*.

Construcción de un MVA recombinante que expresa el gen SS-E2*-TMR de HPV-16

La generación del virus MVATG17408 se llevó a cabo mediante recombinación homóloga en fibroblastos embrionarios de pollo primarios (CEF) infectados con MVATGN33.1 (a una MOI de 0,1 pfu/célula) y se transfectó con pTG17408 (según la precipitación estándar del ADN con fosfato cálcico). Se llevó a cabo la selección vírica mediante purificación de placas en tres rondas en presencia de un medio selectivo que contenía ácido micofenólico, xantina e hipoxantina. Tal como se ha indicado anteriormente, seguidamente se eliminó el marcador de selección mediante pase en un medio no selectivo. La ausencia de contaminación por MVA parental se verificó mediante PCR.

El análisis de la expresión de E2 se llevó a cabo mediante transferencia western. Los CEF se infectaron a una MOI de 0,2 con MVATG17408 y tras 24 horas, se recolectaron las células. El análisis de transferencia western se llevó a cabo utilizando anticuerpo monoclonal anti-E2 comercial TVG271 (Abcam). Se detectó la expresión de una proteína con un peso molecular aparente de 55 kDa, mientras que el peso molecular teórico de E2*-TMR era de 48,9 kDa. Tras el tratamiento de los extractos celulares con endoglucosidasa F, se observó una reducción del tamaño de la proteína recombinante, sugiriendo que E2*-TMR se encontraba modificado mediante N-glucosilación.

Ejemplo 2: Construcción de un MVA recombinante que expresa el gen E1 de HPV-16

Las secuencias de nucleótidos codificantes del polipéptido E1 de HPV16 se clonó a partir de ADN de células CaSki (ATCC n° CRL-1550). Más concretamente, el gen *E1* se amplificó en dos partes E1a (nt1 a 1.102) y E1b (nt 1.001 a 1.950). Se utilizaron los cebadores OTG16811 (SEC ID n° 17) y OTG16814 (SEC ID n° 18) para amplificar el fragmento E1a, que se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y se insertó en pGEX2T cortado con los mismos enzimas, dando lugar a pTG17240. Se generó el fragmento E1b utilizando OTG16813 (SEC ID n° 19) y OTG16812 (SEC ID n° 20) y se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI antes de insertarlo en pGEX2T, resultando en pTG17241. La secuenciación mostró 4 mutaciones en comparación con la secuencia del prototipo E1 de HPV-16 (descrito en GenBank n° NC-01526). Una mutación era silenciosa y las tres mutaciones no silenciosas presentes en E1a (K130Q, N185T y T220S) se

corrigieron mediante mutagénesis sitio-dirigida. A continuación, el gen *E1* completo se reensambló mediante clonación del fragmento *Ela* corregido en pTG17241, digerido con *Bsr*GI y *Eco*RI. El plásmido resultante se denominó pTG17289.

En el genoma de HPV-16, los 59 últimos nucleótidos del gen *E1* son idénticos a los 59 primeros nucleótidos del gen *E2*. La presencia de estas secuencias homólogas pueden generar sucesos de recombinación homóloga y de esta manera, inestabilidad durante las etapas de producción de un vector MVA codificante de *E1* y *E2*. Por lo tanto, dicha parte de las secuencias codificantes de *E1* se modificó mediante degeneración del uso de codones de manera que se reduzca la homología de secuencias con la secuencia codificante de *E2*. La secuencia degenerada se obtuvo mediante amplificación del extremo 3' del gen *E1* utilizando los cebadores degenerados OTG17408 (SEC ID nº 21) y OTG17409 (SEC ID nº 22). El fragmento amplificado se digirió con *Nsi*I y *Bgl*II y se insertó en pTG17289 cortado con los mismos enzimas, dando lugar a pTG17340.

Las secuencias de *E1* degeneradas de HPV-16 también se mutaron mediante mutagénesis sitio-dirigida con el fin de anular la función de replicación del polipéptido *E1* codificado, mediante la sustitución del residuo Gly en posición 482 del *E1* de HPV-16 con un residuo Asp (G482D, también denominado en la presente memoria *E1**), resultando en pTG17373.

Las secuencias *Eldeg** de HPV-16 también se modificaron de manera que dirigiese la expresión del polipéptido codificado a la superficie de la célula plasmática mediante fusión con el péptido de señal y las secuencias de anclaje a membrana derivadas de la glucoproteína del virus de la rabia (descrito en GenBank nº M38452). Se reconstituyó la secuencia de SS-*Eldeg**-TMR mediante triple PCR utilizando los cebadores siguientes: OTG17560 (SEC ID nº 23), OTG17561 (SEC ID nº 24), OTG17562 (SEC ID nº 25), OTG17563 (SEC ID nº 26), OTG17564 (SEC ID nº 27) y OTG17565 (SEC ID nº 28). La secuencia resultante (SEC ID nº 7) se insertó en un vector derivado de pBS (Stratagene), proporcionando pTG17404. A continuación, se clonó la secuencia de SS-*Eldeg**-TMR en el plásmido de transferencia tal como se describe en el Ejemplo 1, cadena abajo del promotor p7.5K (Cochran *et al.*, J. Virol. 54:30-37, 1985), dando lugar a pTG17409 (figura 2).

La generación de los virus MVATG17409 se llevó a cabo en CEF mediante recombinación homóloga tal como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Construcción de un MVA recombinante que expresa los genes *E1* y *E2* de HPV-16

El SS-*Eldeg**-TMR secuenciado controlado por el promotor p7.5K se aisló a partir de pTG17409 y se insertó en pTG17408, dando lugar a pTG17410.

La generación de los virus MVATG17410 se llevó a cabo en CEF mediante recombinación homóloga tal como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 4: Construcción de un MVA recombinante que expresa los genes *E1*, *E2*, *E6* y *E7* de HPV-16

Se aisló el gen *E7* de HPV-16 y se modificó tal como se describe en el documento WO 99/03885 para codificar un polipéptido *E7* no oncogénico y dirigido a membrana, que se ilustra en SEC ID nº 5. La mutación no oncogénica se llevó a cabo mediante delección de los residuos aminoácidos 21 a 26 (DLYCYE) y direccionamiento a membrana mediante la fusión al péptido de señal y secuencias de anclaje a membrana de la glucoproteína del virus de la rabia. La secuencia resultante se clonó bajo el control del promotor temprano-tardío pH5R. A continuación, se introdujo el casete de expresión en pTG17410, generando pTG17482.

Se aisló el gen *E6* de HPV-16 y se modificó tal como se describe en el documento WO 99/03885 para codificar un polipéptido *E6* no oncogénico y direccionado a membrana, que se ilustra en SEC ID nº 4. Se llevó a cabo una mutación no oncogénica mediante delección de los residuos aminoácidos 118 a 122 (CPEEK) y direccionamiento a membrana mediante fusión al péptido de señal y secuencias de anclaje a membrana de la proteína F del virus del sarampión. La secuencia resultante se clonó bajo el control del promotor p7.5K. A continuación, se introdujo el casete de expresión en pTG17482, generando pTG17483.

La generación de NWATG174783 se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 5: Evaluación de la respuesta de Th1 específica de *E2* de HPV-16 en ratones

Se evaluó la respuesta de Th1 específica de *E2* de HPV-16 mediante ELISPOT en ratones inyectados con MVATG17408 (MVA-*E2*). Se seleccionaron péptidos del MHC de clase I restringidos a HLA-A0201 humanos y restringidos a H2^b, específicos de genotipo, predichos por SYFPEITHI y BIMAS, para analizar las células productoras de IFN γ en respuesta a *E2*. Se muestran estos péptidos en la tabla I a continuación.

	posición	secuencia	nombre	Puntuación SYFPEITHI	Puntuación BIMAS
E2-HPV16/ H2-D ^b	129	MHYTNWTHI	M9I	24	67
	280	NCNSNTTPI	N9I	23	117
	51	FKHINHQVV	F9V	19	<10
	71	QAIELQLTL	Q9L	19	30
	348	SQVKIPKTI	S9I	19	39
E2-HPV16/ HLA-A0201	138	YICEEASVTV	Y9V	26	<10
	69	ALQAIQLQL	A9L	20	21
	7	RLNVCQDKIL	R10L	20	<10
	93	TLQDVSLEV	T9V	19	285
E2-HPV18/ H2-D ^b	166	KEGYNTFYI	K9I	24	< 10
	40	IRWENAIFF	I9F	22	<10
	281	LCSGNTTPI	L9I	22	84
	344	TKFLNTVAI	T9I	22	58
	196	NVIDCNDMSM	N9M	15	61

Se inmunizaron los ratones C57B1/6 hembra por vía subcutánea 3 veces (los días 0, 7 y 14) con 5×10^7 pfu de MVATGN33 (control negativo) o MVATG17408 (MVA-E2). Se extirparon los bazo el día 21 tras la primera inmunización y se realizó una ELISPOT de IFN γ utilizando los péptidos anteriormente indicados a una concentración de 5 μ g/ml. Se llevó a cabo ELISPOT utilizando el kit ELISPO^{PLUS} IFN γ Mabtech AB de ratón (Mabtech, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó un recuento de las manchas utilizando el lector Elispot Bioreader 4000 Pro-X (BIOSYS-GmbH; Serlabo, Francia). Se obtuvieron resultados tras la substracción del fondo irrelevante de péptidos.

Tal como se ilustra en la figura 3, los cuatro péptidos presentaban un número significativo de esplenocitos productores de IFN γ , en comparación con la respuesta de fondo medida en animales vacunados con MVA-N33. Todos dichos péptidos eran específicos de HPV16. Se definieron F9V y N9I en el contexto de H2-Db de ratón, y se definió A9L y T9V en el contexto de HLA-A201 humano. Debe indicarse que se ha descrito que el péptido A9L induce una respuesta específica de CTL (Konya *et al.*, J. Gen. Virol. 78:2615-20, 1997).

En conclusión, tal como se demuestra mediante ELISPOT, la inyección subcutánea de MVATG17408 induce una respuesta de células T contra HPV16 en los ratones vacunados.

Ejemplo 6: Construcción de un vector MVA recombinante que expresa genes E1 y E2 de HPV-18 (MVATG17582)

Se reconstituyeron los genes E1 y E2 de HPV-18 como genes sintéticos y se diseñaron los oligonucleótidos para reducir la homología a un nivel inferior a 75% entre la porción de 59 nucleótidos presentes tanto en el extremo 3' de la secuencia de E1 de HPV-18 nativa y en el extremo 5' de la secuencia de E2 de HPV-18 y para introducir las mutaciones que anulan las funciones enzimáticas del producto génico E1 y E2 de HPV-18 (E1: G489D; E2: E43A y 177A). También se diseñó la secuencia de E1 de HPV-18 sintético para reducir el porcentaje de homología entre las partes homólogas compartidas por las secuencias nativas de HPV-16 y HPV-18 hasta un nivel inferior a 75%. Con este fin, las secuencias de nucleótidos de los genes E1 y E2 de HPV-16 y HPV-18 se alinearon y se diseñaron los oligonucleótidos para reducir la homología a menos de 6 nucleótidos consecutivos.

Se reconstituyó la secuencia de degE1* de HPV-18 mediante ensamblaje de 50 oligonucleótidos y se clonó en un vector pBS, dando lugar a pTG17473. A continuación, se fusionó la secuencia de E1 a la secuencia de nucleótidos codificante de los péptidos de señalización procedentes de la proteína F del virus del sarampión (SS-18E1deg*-TMF) mediante una triple PCR utilizando los cebadores OTG15315 (SEC ID n° 39), OTG17881 (SEC ID n° 40), OTG17882 (SEC ID n° 41), OTG17883 (SEC ID n° 42), OTG17884 (SEC ID n° 43) y OTG17885 (SEC ID n° 44). El fragmento resultante (SEC ID n° 38) codificante del polipéptido SS18degE1*-TMF se clonó en un vector de transferencia MVA bajo el control del promotor p7.5K, generando pTG17521.

La secuencia de degE2* de HPV-18 se reconstituyó mediante el ensamblaje de 26 oligonucleótidos y se clonó en un vector pBS, dando lugar a pTG17498. La fusión con los péptidos de señal y de anclaje a membrana de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa ERA, GenBank n° M38452) se llevó a cabo mediante PCR triple utilizando los cebadores OTG17875 (SEC ID n° 45), OTG17876 (SEC ID n° 46), OTG17877 (SEC ID n° 47), OTG17878 (SEC ID n° 48), OTG17879 (SEC ID n° 49) y OTG17880 (SEC ID n° 50). El fragmento resultante (SEC ID n° 33) codificante de los polipéptidos SS-18E2*-TMR se insertó en el plásmido de transferencia MVA cadena abajo del promotor pH5R, dando lugar a pTG17552. Finalmente, se aisló el casete p7.5K-SS-Eldeg*-TMF a partir de pTG17521 y se insertó en pTG17552, dando lugar a pTG17582.

Se llevó a cabo la generación de MVATG17521, MVATG17552 y MVATG17582 recombinantes tal como se ha descrito anteriormente. Tras la infección de las células cultivadas, se confirmó la expresión del polipéptido E1 de HPV-18 de los constructos de MVA mediante transferencia western utilizando sueros obtenidos de conejos

inmunizados.

Ejemplo 7: Construcción de un vector MVA recombinante multivalente que expresaba genes E1 y E2 de HPV-16 y HPV-18 (MVATG17583)

El casete p7.5K-SS-18E1deg*-TMF y el casete pH5R-SS-18E2*-TMR se introdujeron en pTG17410 (que contenía el casete p7.5K-SS-16E1deg*-TMR y pH5R-SS-16E2*-TMR) y el plásmido de transferencia resultante se denominó pTG17583. La generación de MVATG17583 se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente. Tras la infección con MVA TG17583 de las células cultivadas, la expresión de los polipéptidos E1 de HPV-16, E2 de HPV-16 y E1 de HPV-18 se confirmó mediante transferencia western utilizando sueros obtenidos a partir de conejos inmunizados.

Ejemplo 8: Construcción de un vector MVA recombinante que expresa el gen E2 de HPV-33

Un gen sintético codificante del polipéptido E2 de HPV-33 fue sintetizado por Geneart (Regensburg, Alemania). Se diseñó la secuencia sintética con el fin de: (i) reducir el porcentaje de homología a un nivel inferior a 75% respecto a los genes E2 de HPV-16, HPV-18 y HPV-52 (si resulta posible, se reducen las porciones homólogas a menos de 6 nucleótidos consecutivos), e (ii) introducir las mutaciones que anulan las funciones enzimáticas del producto génico de HPV-33 (E39A e I73A).

A continuación, se fusionó la secuencia de degE2* de HPV-33 con la secuencia de nucleótidos codificante de los péptidos de señal y de anclaje a membrana de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa ERA, GenBank nº M38452). Lo anterior se llevó a cabo mediante triple PCR utilizando los cebadores OTG18962 (SEC ID nº 51), OTG18963 (SEC ID nº 52), OTG18964 (SEC ID nº 53), OTG18965 (SEC ID nº 54), OTG18966 (SEC ID nº 55) y OTG18967 (SEC ID nº 56). El fragmento resultante (SEC ID nº 35) codificante del polipéptido SS-33degE2*-TMR se clonó en un vector de transferencia MVA bajo el control del promotor p7.5K, y se generaron partículas víricas tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 9: Construcción de un vector MVA recombinante que expresa el gen E2 de HPV-52

Un gen sintético codificante del polipéptido E2 de HPV-52 fue sintetizado por Geneart (Regensburg, Alemania). Se diseñó la secuencia sintética con el fin de: (i) reducir el porcentaje de homología hasta un nivel inferior a 75% con genes E2 de HPV-16, HPV-18 y HPV-33 (las porciones homólogas se redujeron preferentemente a menos de 6 nucleótidos consecutivos), e (ii) introducir las mutaciones que anulan las funciones enzimáticas del producto génico de HPV-52 (E39A e I73A).

A continuación, se fusionó la secuencia sintética de E2*deg de HPV-52 con las secuencias de nucleótidos codificantes de los péptidos de señal y de anclaje de membrana de la proteína F del virus del sarampión (proporcionando SS-52E2*deg-TMF) mediante una triple PCR utilizando los cebadores OTG18968 (SEC ID nº 57), OTG18969 (SEC ID nº 58), OTG18970 (SEC ID nº 59), OTG18971 (SEC ID nº 60), OTG18972 (SEC ID nº 61) y OTG18973 (SEC ID nº 62).

El fragmento resultante (SEC ID nº 37) codificante del polipéptido SS-52E2*deg-TMF se insertó en un plásmido de transferencia MVA cadena abajo del promotor p7.5K y se generaron partículas víricas tal como se ha indicado anteriormente.

Ejemplo 10: Construcción de un vector MVA recombinante multivalente que expresaba el gen E2 de HPV-16, HPV-18, HPV-33 y HPV-52

El casete pH5R-SS-18E2*-TMR codificante del polipéptido E2 de HPV-18 presentado en membrana y enzimáticamente defectuoso (aislado a partir de pTG17552), el casete p7.5K-SS-33degE2*-TMR codificante del polipéptido E2 de HPV-33 presentado en membrana y enzimáticamente defectuoso y el casete p7.5K-SS-52degE2*-TMF codificante del polipéptido E2 de HPV-52 presentado en membrana y enzimáticamente defectuoso se introdujeron en pTG17408 (que contenía el casete pH5R-SS-16E2*-TMR) y se generaron partículas víricas tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 11: Modelo animal para la evaluación de la eficacia terapéutica de los constructos recombinantes de MVA

El modelo de CRPV es el único modelo de laboratorio en el que los papilomas inducidos víricamente persisten a pesar de la inmunocompetencia y evolucionan bajo presión selectiva del huésped en carcinomas de células escamosas invasivos y metastásicos (Brandsma, Intervirology 37:189-190, 1994, y Brandsma, Animal models for human papillomavirus vaccine development, páginas 69 a 78, 1996, en: C. Lacey (editor), Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses, Leeds University Press, Leeds, Reino Unido). El MVA que expresa E2 pudo someterse a ensayo en este modelo con el fin de evaluar su eficacia terapéutica con respecto al papilomavirus persistente. Sin embargo, debido a la falta de protección cruzada entre los antígenos de HPV y de CRPV, se generaron constructos de MVA recombinantes específicos de CRPV con los antígenos de CRPV (dados a conocer

en GenBank bajo el número de acceso NC_001541) sustituyendo sus contrapartidas de HPV-16. Más concretamente, se construyeron los MVA recombinantes siguientes: MVATG17535 que comprende insertado en la delección III el casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido E2 de CRPV (secuencia de referencia) fusionado con los péptidos de señal y de anclaje de membrana de la glucoproteína F del virus del sarampión (SR-CRPVE2-TMF) situado bajo el control del promotor pH5R; MVATG17534 que comprende insertado en la delección III el casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido E1 de CRPV (secuencia de referencia) fusionado con los péptidos de señal y de anclaje a membrana de la glucoproteína del virus de la rabia (SR-CRPVE1-TMR) situado bajo el control del promotor p7.5K, y MVATG17562 que comprende insertado en la delección III los casetes de expresión E2 de CRPV (pH5R-SR-CRPVE2-TMF) y E1 de CRPV (p7.5K-SR-CRPVE1-TMR).

Se inocularon conejos hembra blancos New Zealand con ADN de CRPV el día 1 utilizando la transferencia de ADN mediada por partículas con el sistema de pistola génica Helios (Biorad). Se recubrieron partículas de oro de 1,6 µm con ADN vírico tal como indica el fabricante y se administraron a razón de 0,1 µg por sitio en tres sitios y de 0,5 µg por sitio en tres otros sitios en el lomo del conejo. Los días 2, 9 y 16, se inyectó MVA recombinante de CRPV por vía intradérmica en el lomo del conejo. Se realizó un seguimiento del desarrollo de verrugas semanalmente durante 8 a 12 semanas.

Al final del experimento, se sacrificaron los conejos y los sitios epidérmicos en los que se había inyectado ADN de CRPV y que no presentaban papilomas se extirparon y se congelaron. Se extrajeron los ADN y se sometió a ensayo la presencia de ADN de CRPV mediante análisis de PCR para determinar si la vacunación con MVA había inducido la eliminación vírica.

Listado de secuencias

- <110> TRANSGENE S.A.
BAUDIN Martine
5 BALLOUL Jean-Marc
SILVESTRE Nathalie
- <120> Vacuna de papilomavirus
- 10 <130> TG182 EXT
- <150> EP07360004.1
<151> 2007-01-30
- 15 <150> EP07360018.1
<151> 2007-05-15
- <160> 62
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 365
<212> PRT
- 25 <213> Papilomavirus humano de tipo 16
- <400> 1

```

Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu
 1          5          10          15
Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr
          20          25          30
Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu
          35          40          45
Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val
 50          55          60
Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu
 65          70          75          80
Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp
          85          90          95
Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys
          100          105          110
His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr
          115          120          125
Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser
          130          135          140
Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val
          145          150          155          160
His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu
          165          170          175
Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val
          180          185          190
Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro
          195          200          205
Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr
          210          215          220
Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg
          225          230          235          240
Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu
          245          250          255
Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn
          260          265          270
Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile
          275          280          285
Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg
          290          295          300
Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His
          305          310          315          320

```

ES 2 370 674 T3

Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr
 325 330 335
 Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile
 340 345 350
 Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile
 355 360 365

<210> 2

<211> 453

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de E2 de HPV-16 defectuosa y presentada en membrana

10

<400> 2

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu Asn Val
 20 25 30
 Cys Gln Asp Lys Ile Leu Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr Asp Leu
 35 40 45
 Arg Asp His Ile Asp Tyr Trp Lys His Met Arg Leu Ala Cys Ala Ile
 50 55 60
 Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val
 65 70 75 80
 Val Pro Thr Leu Ala Val Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ala Glu
 85 90 95
 Leu Gln Leu Thr Leu Glu Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu
 100 105 110
 Lys Trp Thr Leu Gln Asp Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro
 115 120 125
 Thr Gly Cys Ile Lys Lys His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp
 130 135 140
 Gly Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr
 145 150 155 160
 Ile Cys Glu Glu Ala Ser Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr
 165 170 175
 Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln
 180 185 190
 Phe Lys Asp Asp Ala Glu Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val
 195 200 205
 His Ala Gly Gly Gln Val Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser
 210 215 220
 Asn Glu Val Ser Ser Pro Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His
 225 230 235 240
 Pro Ala Ala Thr His Thr Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr
 245 250 255
 Gln Thr Thr Ile Gln Arg Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro
 260 265 270
 Cys His Thr Thr Lys Leu Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro
 275 280 285
 Ile Leu Thr Ala Phe Asn Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn
 290 295 300
 Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu
 305 310 315 320
 Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala
 325 330 335
 Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser
 340 345 350
 Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe
 355 360 365
 Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe
 370 375 380
 Met Ser Ile Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met
 385 390 395 400
 Leu Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu
 405 410 415
 Ser Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr
 420 425 430
 Ser Gln Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly
 435 440 445
 Gly Glu Thr Arg Leu
 450

<210> 3

<211> 737

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de E1 de HPV-16 defectuosa en la replicación y presentada en la membrana

10 <400> 3

```

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1      5      10      15
Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Ala Asp Pro Ala Gly Thr Asn Gly Glu
20      25      30
Glu Gly Thr Gly Cys Asn Gly Trp Phe Tyr Val Glu Ala Val Val Glu
35      40      45
Lys Lys Thr Gly Asp Ala Ile Ser Asp Asp Glu Asn Glu Asn Asp Ser
50      55      60
Asp Thr Gly Glu Asp Leu Val Asp Phe Ile Val Asn Asp Asn Asp Tyr
65      70      75      80
Leu Thr Gln Ala Glu Thr Glu Thr Ala His Ala Leu Phe Thr Ala Gln
85      90      95
Glu Ala Lys Gln His Arg Asp Ala Val Gln Val Leu Lys Arg Lys Tyr
100     105     110
Leu Gly Ser Pro Leu Ser Asp Ile Ser Gly Cys Val Asp Asn Asn Ile
115     120     125
Ser Pro Arg Leu Lys Ala Ile Cys Ile Glu Lys Gln Ser Arg Ala Ala
130     135     140
Lys Arg Arg Leu Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gly Tyr Gly Asn Thr Glu
145     150     155     160
Val Glu Thr Gln Gln Met Leu Gln Val Glu Gly Arg His Glu Thr Glu
165     170     175
Thr Pro Cys Ser Gln Tyr Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys Ser Gln
180     185     190
Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Gly Glu Gly Val Ser Glu Arg His Thr Ile
195     200     205
Cys Gln Thr Pro Leu Thr Asn Ile Leu Asn Val Leu Lys Thr Ser Asn
210     215     220
Ala Lys Ala Ala Met Leu Ala Lys Phe Lys Glu Leu Tyr Gly Val Ser
225     230     235     240
Phe Ser Glu Leu Val Arg Pro Phe Lys Ser Asn Lys Ser Thr Cys Cys
245     250     255
Asp Trp Cys Ile Ala Ala Phe Gly Leu Thr Pro Ser Ile Ala Asp Ser
260     265     270
Ile Lys Thr Leu Leu Gln Gln Tyr Cys Leu Tyr Leu His Ile Gln Ser
275     280     285
Leu Ala Cys Ser Trp Gly Met Val Val Leu Leu Leu Val Arg Tyr Lys
290     295     300
Cys Gly Lys Asn Arg Glu Thr Ile Glu Lys Leu Ser Lys Leu Leu
305     310     315     320
Cys Val Ser Pro Met Cys Met Met Ile Glu Pro Pro Lys Leu Arg Ser
325     330     335
Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Trp Tyr Lys Thr Gly Ile Ser Asn Ile Ser
340     345     350
Glu Val Tyr Gly Asp Thr Pro Glu Trp Ile Gln Arg Gln Thr Val Leu
355     360     365
Gln His Ser Phe Asn Asp Cys Thr Phe Glu Leu Ser Gln Met Val Gln
370     375     380
Trp Ala Tyr Asp Asn Asp Ile Val Asp Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Lys
385     390     395     400
Tyr Ala Gln Leu Ala Asp Thr Asn Ser Asn Ala Ser Ala Phe Leu Lys
405     410     415
Ser Asn Ser Gln Ala Lys Ile Val Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Arg
420     425     430
His Tyr Lys Arg Ala Glu Lys Lys Gln Met Ser Met Ser Gln Trp Ile
435     440     445
Lys Tyr Arg Cys Asp Arg Val Asp Asp Gly Gly Asp Trp Lys Gln Ile
450     455     460
Val Met Phe Leu Arg Tyr Gln Gly Val Glu Phe Met Ser Phe Leu Thr
465     470     475     480
Ala Leu Lys Arg Phe Leu Gln Gly Ile Pro Lys Lys Asn Cys Ile Leu
485     490     495
Leu Tyr Gly Ala Ala Asn Thr Asp Lys Ser Leu Phe Gly Met Ser Leu
500     505     510

```

ES 2 370 674 T3

Met Lys Phe Leu Gln Gly Ser Val Ile Cys Phe Val Asn Ser Lys Ser
 515 520 525
 His Phe Trp Leu Gln Pro Leu Ala Asp Ala Lys Ile Gly Met Leu Asp
 530 535 540
 Asp Ala Thr Val Pro Cys Trp Asn Tyr Ile Asp Asp Asn Leu Arg Asn
 545 550 555 560
 Ala Leu Asp Gly Asn Leu Val Ser Met Asp Val Lys His Arg Pro Leu
 565 570 575
 Val Gln Leu Lys Cys Pro Pro Leu Leu Ile Thr Ser Asn Ile Asn Ala
 580 585 590
 Gly Thr Asp Ser Arg Trp Pro Tyr Leu His Asn Arg Leu Val Val Phe
 595 600 605
 Thr Phe Pro Asn Glu Phe Pro Phe Asp Glu Asn Gly Asn Pro Val Tyr
 610 615 620
 Glu Leu Asn Asp Lys Asn Trp Lys Ser Phe Phe Ser Arg Thr Trp Ser
 625 630 635 640
 Arg Leu Ser Leu His Glu Asp Glu Asp Lys Glu Asn Asp Gly Asp Ser
 645 650 655
 Leu Pro Thr Phe Lys Cys Val Ser Gly Gln Asn Thr Asn Thr Leu Tyr
 660 665 670
 Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
 675 680 685
 Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln Arg
 690 695 700
 Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr Ser Gln Ser Gly
 705 710 715 720
 Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg
 725 730 735
 Leu

<210> 4

5 <211> 243

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> variante de E6 de HPV-16 no oncogénica y presentada en la membrana

<400> 4

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Met His Gln Lys
 20 25 30
 Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro
 35 40 45
 Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu
 50 55 60
 Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe
 65 70 75 80
 Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala
 85 90 95
 Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg
 100 105 110
 His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn
 115 120 125
 Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly
 145 150 155 160
 Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg
 165 170 175
 Arg Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ser Ser Thr Ser Ile Val Tyr Ile Leu
 180 185 190
 Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ile Pro Ala Leu Ile Cys
 195 200 205
 Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly Glu Gln Val Gly Met Ser
 210 215 220
 Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val
 225 230 235 240
 Arg Ser Leu

<210> 5

<211> 185

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de E7 de HPV-16 no oncogénica y presentada en la membrana

5

<400> 5

```

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1      5      10      15
Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Met His Gly Asp Thr Pro Thr
      20      25      30
Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Gln Leu Asn
      35      40      45
Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala
      50      55      60
Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys
      65      70      75      80
Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg
      85      90      95
Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
      100      105      110
Cys Ser Gln Lys Pro Arg Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu
      115      120      125
Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val
      130      135      140
Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu
      145      150      155      160
Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser
      165      170      175
His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
      180      185

```

10

<210> 6

<211> 59

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> Porción de 59 nucleótidos de la secuencia codificante de E1 de HPV-16 degenerada para disminuir la homología con la secuencia codificante de E2 de HPV-16 de solapamiento

20

<400> 6

atggtgattc attacctaca ttcaagtgcg tatctggtca gaacacaaat actttgtga

59

<210> 7

25

<211> 2214

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

30

<223> secuencia que codifica un polipéptido E1 de HPV-16 defectuoso y dirigido a la membrana que comprende la secuencia degenerada de 59 nucleótidos

<400> 7

```

atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttatttggctc tccccctctg ttccggtaag      60
tttccctatag ctgatcctgc aggtaccaat ggggaagagg gtacgggatg taatggatgg      120
ttttatgtag aggctgtagt ggaaaaaaaaa acaggggatg ctatatacaga tgacgagaac      180
gaaaatgaca gtgatacagg tgaagatttg gtagatttta tagtaaatga taatgattat      240
ttaacacagg cagaaacaga gacagcacat gcgttgttta ctgcacagga agcaaaacaa      300
catagagatg cagtacaggt tctaaaacga aagtatttgg gtagtccact tagtgatatt      360
agtggatgtg tagacaataa tattagtcct agattaaaag ctatatgtat agaaaaacaa      420
agtagagctg caaaaaggag attatttgaa agcgaagaca gcgggtatgg caatactgaa      480
gtggaaactc agcagatgtt acaggtagaa gggcgccatg agactgaaac accatgtagt      540
cagtatagtg gtggaagtgg ggytggttgc agtcagtaca gtagtggaag tgggggagag      600
ggtgttagtg aaagacacac tatatgcaa acaccactta caaatatttt aaatgtacta      660
aaaactagta atgcaaaagg agcaatgtta gcaaaattta aagagttata cgggggtgagt      720
ttttcagaat tagtaagacc atttaaaagt aataaatcaa cgtgttgcga ttggtgtatt      780
gtgcatttg gacttacacc cagtatagct gacagtataa aaacactatt acaacaatat      840
tgtttatatt tacacattca aagtttagca tgttcattgg gaattggtgt gttactatta      900
gtaagatata aatgtggaaa aaatagagaa acaattgaaa aattgctgtc taaactatta      960

```

35

tgtgtgtctc	caatgtgtat	gatgatagag	cctccaaaat	tgcgtagtac	agcagcagca	1020
ttatattggg	ataaaacag	tatatcaaat	attagtgaag	tgtatggaga	cacgccagaa	1080
tggtatacaa	gacaaacagt	attacaacat	agtttttaag	attgtacatt	tgaattatca	1140
cagatgggtac	aatgggccta	cgataatgac	atagtagacg	atagtgaat	tgcataataa	1200
tatgcacaat	tggtcagacac	taatagtaat	gcaagtgcct	ttctaaaaag	taattcacag	1260
gcaaaaattg	taaaggattg	tgcaacaatg	tgtagacatt	ataaacgagc	agaaaaaaa	1320
caaatgagta	tgagtcaatg	gataaaatat	agatgtgata	gggtagatga	tggaggtgat	1380
tggaaagcaa	ttgttatgtt	tttaaggat	caagggtgag	agtttatgtc	atttttaact	1440
gcattaaaaa	gatttttgca	aggcatacct	aaaaaaatt	gcataattact	atatggtgca	1500
gctaacacag	ataaatcatt	atttggtag	agtttaata	aatttctgca	agggctctga	1560
atatgttttg	taaattctaa	aagccatttt	tggttacaac	cattagcaga	tgccaaaata	1620
ggtatgttag	atgatgctac	agtgcctgt	tggaaactata	tagatgacaa	tttaagaaat	1680
gcattggatg	gaaatttagt	ttctatggat	gtaaagcata	gaccattggg	acaactaaaa	1740
tgcctccat	tatttaattac	atctaacatt	aatgctggta	cagattctag	gtggccttat	1800
ttacataata	gattgggtgt	gtttacattt	cctaattgagt	ttccatttga	cgaaaacgga	1860
aatccagtgt	atgagcttaa	tgataagaac	tggaaatcct	ttttctcaag	gacgtggtcc	1920
agattaagtt	tgacagagga	cgaggacaag	gaaaacgatg	gtgattcatt	acctacattc	1980
aagtgcgtat	ctggtcagaa	cacaaatact	ttgtacgtac	tgctatcggc	aggcacgttg	2040
atcgactata	cttctatcat	cttctataa	acctgctgca	agcgggttga	taggcccgaa	2100
agtacccaaa	ggtccttgag	aggtaccgga	cgcaacgtat	cgtaacgtc	gcaaagcggc	2160
aagttcatta	gcagttggga	gtcgacacaa	tcaggtggag	agaccgcct	gtga	2214

<210> 8

<211> 1362

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido E2 de HPV-16 defectuoso y dirigido a la membrana

<400> 8

atggtaccac	aagcgtgtt	acttgtccca	ctgcttggtt	tctctttatg	ttttggaaaa	60
ttcccaatag	agactctttg	ccaacgttta	aatgtgtgtc	aggacaaaat	actaacacat	120
tatgaaaatg	atagtacaga	cctacgtgac	catatagact	attggaaca	catgccccta	180
gcatgtgcta	tttattacaa	ggccagagaa	atgggattta	aacatattaa	ccaccaggtg	240
gtgccaacgc	tggctgtatc	aaagaataaa	gcattacaag	cagctgaact	gcaactaacg	300
ttagaacaa	tataaactc	acaatatagt	aatgaaaagt	ggacattaca	agacgttagc	360
cttgaagtgt	atttaactgc	accaaaggga	tgtataaaaa	aacatggata	tacagtggaa	420
gtgcagtttg	atggagacat	atgcaatata	atgcattata	caaactggac	acatatatat	480
atttgtgaag	aagcatcagt	aactgtggta	gagggtcaag	ttgactatta	tggtttatat	540
tatgtttcatg	aaggaaatag	aacatatatt	gtgcagttta	aagatgatgc	agaaaaatat	600
agtaaaaaata	aagtatggga	agttcatgag	ggtggtcagg	taatattatg	tcctacatct	660
gtgttttagca	gcaacgaagt	atcctctcct	gaaattatta	ggcagcactt	ggccaaccac	720
cccgcgcgga	cccataccaa	agccgtcgcc	ttgggcaccg	aagaaacaca	gacgactatc	780
cagcgaccaa	gatcagagcc	agacaccgga	aacccctgcc	acaccactaa	gttgttgca	840
agagactcag	tggtcaggtc	tccaatcctc	actgcattta	acagctcaca	caaaggacgg	900
attaactgta	atagtaaac	tacaccata	gtacatttaa	aagggtgatgc	taatacttta	960
aaatgttttaa	gatatagatt	taaaaagcat	tgtacattgt	atactgcagt	gtcgtctaca	1020
tggcattgga	caggacataa	tgtaaaacat	aaaagtgcaa	ttgttacct	tacatatgat	1080
agtgaatggc	aacgtgacca	atttttgtct	caagttaaaa	taccaaaaac	tattacagt	1140
tctactggat	ttatgtctat	atatgttctt	ctctctgctg	gaactttaat	agctttaatg	1200
ttataaatat	tcttaataac	gtgctgtaaa	agggtagacc	gtccagagtc	aactcagcgc	1260
agccttaggg	gtactgggag	aaatgtttcc	gtgacatcac	agagtggaaa	atttatctcg	1320
tcttgggaat	ctcataagag	tggagcgcaa	acacgtcttt	ga		1362

15 <210> 9

<211> 34

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> cebador sentido

<400> 9

25 aaacccggat ccatggagac tctttgccaa cggt

<210> 10

<211> 49

<212> ADN

30 <213> secuencia artificial

	<220>		
	<223> cebador antisentido		
	<400> 10		
5	aaacccgaat tcaagcttag atcttcatat agacataaat ccagtagac		49
	<210> 11		
	<211> 33		
10	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador sentido		
15	<400> 11		
	aaacccggat ccatggtacc acaagcgctg tta		33
20	<210> 12		
	<211> 53		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador sentido		
	<400> 12		
30	tctctttatg ttttgaaaa ttccaatag agactcttg ccaacgtta aat		53
	<210> 13		
	<211> 53		
	<212> ADN		
35	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador antisentido		
40	<400> 13		
	atttaaactg tggcaaagag tctctattgg gaattttcca aaacataaag aga		53
45	<210> 14		
	<211> 49		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> cebador sentido		
	<400> 14		
55	cagtgtctac tggatttatg tctatatatg ttctctctc tgctggaac		49
	<210> 15		
	<211> 49		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> cebador antisentido		
	<400> 15		
65	gttcagcag agagaagaac atatatagac ataaatccag tagacactg		49

5	<210> 16 <211> 44 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> cebador sentido	
10	<400> 16 aaacccagat ctcaaagac gtgtttcgcc tccactctta tgag	44
15	<210> 17 <211> 34 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> cebador sentido	
20	<400> 17 aaacccggat ccatggctga tcctgcaggt acca	34
25	<210> 18 <211> 34 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> cebador antisentido	
30	<400> 18 aaacccgaat tcattatcg taggccatt gtac	34
35	<210> 19 <211> 32 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> cebador sentido	
40	<400> 19 aaacccggat ccgagacacg ccagaatgga ta	32
45	<210> 20 <211> 50 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> cebador antisentido	
50	<400> 20 aaacccgaat tcaagcttag atctcataa tgtgttagta tttgtcctg	50
55	<210> 21 <211> 88 <212> ADN <213> secuencia artificial	
60		
65		

ES 2 370 674 T3

	<220>		
	<223> cebador antisentido		
	<400> 21		
5	aaaccagat cttcacaag tatttggtt ctgaccagat acgcacttga atgtaggtaa	60	
	tgaatcacca tcgttttcct tgcctcgc	38	
	<210> 22		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> cebador sentido		
	<400> 22		
	gatgctacag tgccctgttg g		21
20	<210> 23		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador sentido		
	<400> 23		
30	aaaccaagg atccatggta ccgcaagccc tgcta		35
	<210> 24		
	<211> 52		
35	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador sentido		
40	<400> 24		
	ttccctctg ttccggaag ttccctatag ctgacctgc aggtaccaat gg		52
45	<210> 25		
	<211> 52		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> anticebador sentido		
	<400> 25		
55	ccattggtac ctgcaggatc agctatagga aactaccga aacagagggg aa		52
	<210> 26		
	<211> 50		
	<212> ADN		
60	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador sentido		
65	<400> 26		

tatctggtca gaacacaaat actttgtacg tactgtatc ggcaggcacg 50

<210> 27
5 <211> 50
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> cebador antisentido

<400> 27

cgtgcctgcc gatagcagta cgtacaaagt atttgtgtc tgaccagata 50

<210> 28
15 <211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
20 <223> anticebador sentido

<400> 28

aaacccaaag atcttcacag gcgggtctct ccacctgatt tg 42

<210> 29
30 <211> 453
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
35 <223> polipéptido E2 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana de HPV-18 (SS-18 E2*-TMR)

<400> 29

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15
Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gln Thr Pro Lys Glu Thr Leu Ser Glu
20 25 30
Arg Leu Ser Cys Val Gln Asp Lys Ile Ile Asp His Tyr Glu Asn Asp
35 40 45
Ser Lys Asp Ile Asp Ser Gln Ile Gln Tyr Trp Gln Leu Ile Arg Trp
50 55 60
Ala Asn Ala Ile Phe Phe Ala Ala Arg Glu His Gly Ile Gln Thr Leu
65 70 75 80
Asn His Gln Val Val Pro Ala Tyr Asn Ile Ser Lys Ser Lys Ala His
85 90 95
Lys Ala Ala Glu Leu Gln Met Ala Leu Gln Gly Leu Ala Gln Ser Arg
100 105 110
Tyr Lys Thr Glu Asp Trp Thr Leu Gln Asp Thr Cys Glu Glu Leu Trp
115 120 125
Asn Thr Glu Pro Thr His Cys Phe Lys Lys Gly Gly Gln Thr Val Gln
130 135 140
Val Tyr Phe Asp Gly Asn Lys Asp Asn Cys Met Thr Tyr Val Ala Trp
145 150 155 160
Asp Ser Val Tyr Tyr Met Thr Asp Ala Gly Thr Trp Asp Lys Thr Ala
165 170 175
Thr Cys Val Ser His Arg Gly Leu Tyr Tyr Val Lys Glu Gly Tyr Asn
180 185 190
Thr Phe Tyr Ile Glu Phe Lys Ser Glu Cys Glu Lys Tyr Gly Asn Thr
195 200 205
Gly Thr Trp Glu Val His Phe Gly Asn Asn Val Ile Asp Cys Asn Asp
210 215 220
Ser Met Cys Ser Thr Ser Asp Asp Thr Val Ser Ala Thr Gln Leu Val
225 230 235 240
Lys Gln Leu Gln His Thr Pro Ser Pro Tyr Ser Ser Thr Val Ser Val
245 250 255

Gly Thr Ala Lys Thr Tyr Gly Gln Thr Ser Ala Ala Thr Arg Pro Gly
 260 265 270
 His Cys Gly Leu Ala Glu Lys Gln His Cys Gly Pro Val Asn Pro Leu
 275 280 285
 Leu Gly Ala Ala Thr Pro Thr Gly Asn Asn Lys Arg Arg Lys Leu Cys
 290 295 300
 Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser
 305 310 315 320
 Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg
 325 330 335
 Asp Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr
 340 345 350
 Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe
 355 360 365
 Leu Asn Thr Val Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr
 370 375 380
 Met Thr Met Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met
 385 390 395 400
 Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu
 405 410 415
 Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr
 420 425 430
 Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly
 435 440 445
 Gly Glu Thr Arg Leu
 450

<210> 30

5 <211> 441

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido E2 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana de HPV-33 (SS-33 E2*-TMR)

<400> 30

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15
 Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Glu Glu Ile Ser Ala Arg Leu Asn Ala
 20 25 30
 Val Gln Glu Lys Ile Leu Asp Leu Tyr Glu Ala Asp Lys Thr Asp Leu
 35 40 45
 Pro Ser Gln Ile Glu His Trp Lys Leu Ile Arg Met Ala Cys Ala Leu
 50 55 60
 Leu Tyr Thr Ala Lys Gln Met Gly Phe Ser His Leu Cys His Gln Val
 65 70 75 80
 Val Pro Ser Leu Leu Ala Ser Lys Thr Lys Ala Phe Gln Val Ala Glu
 85 90 95
 Leu Gln Met Ala Leu Glu Thr Leu Ser Lys Ser Gln Tyr Ser Thr Ser
 100 105 110
 Gln Trp Thr Leu Gln Gln Thr Ser Leu Glu Val Trp Leu Cys Glu Pro
 115 120 125
 Pro Lys Cys Phe Lys Lys Gln Gly Glu Thr Val Thr Val Gln Tyr Asp
 130 135 140
 Asn Asp Lys Lys Asn Thr Met Asp Tyr Thr Asn Trp Gly Glu Ile Tyr
 145 150 155 160
 Ile Ile Glu Glu Asp Thr Cys Thr Met Val Thr Gly Lys Val Asp Tyr
 165 170 175
 Ile Gly Met Tyr Tyr Ile His Asn Cys Glu Lys Val Tyr Phe Lys Tyr
 180 185 190
 Phe Lys Glu Asp Ala Ala Lys Tyr Ser Lys Thr Gln Met Trp Glu Val
 195 200 205
 His Val Gly Gly Gln Val Ile Val Cys Pro Thr Ser Ile Ser Ser Asn
 210 215 220
 Gln Ile Ser Thr Thr Glu Thr Ala Asp Ile Gln Thr Asp Asn Asp Asn
 225 230 235 240
 Arg Pro Pro Gln Ala Ala Ala Lys Arg Arg Arg Pro Ala Asp Thr Thr
 245 250 255
 Asp Thr Ala Gln Pro Leu Thr Lys Leu Phe Cys Ala Asp Pro Ala Leu
 260 265 270
 Asp Asn Arg Thr Ala Arg Thr Ala Thr Asn Cys Thr Asn Lys Gln Arg
 275 280 285

15

```

Thr Val Cys Ser Ser Asn Val Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu
290                295                300
Ser Asn Ser Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Lys Glu
305                310                315                320
Leu Tyr Ser Ser Met Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys
                325                330                335
Asn Ser Lys Asn Gly Ile Val Thr Val Thr Phe Val Thr Glu Gln Gln
                340                345                350
Gln Gln Met Phe Leu Gly Thr Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile
                355                360                365
Ser Thr Gly Phe Met Thr Leu Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu
370                375                380
Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val
385                390                395                400
Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn
                405                410                415
Val Ser Val Thr Ser Gln Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser
                420                425                430
His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
                435                440

```

- 5 <210> 31
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

- 10 <220>
 <223> polipéptido E2 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana de HPV-52

<400> 31

- 15
- ```

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
1 5 10 15
Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Glu Ser Ile Pro
20 25 30
Ala Arg Leu Asn Ala Val Gln Glu Lys Ile Leu Asp Leu Tyr Glu Ala
35 40 45
Asp Ser Asn Asp Leu Asn Ala Gln Ile Glu His Trp Lys Leu Thr Arg
50 55 60
Met Ala Cys Val Leu Phe Tyr Lys Ala Lys Glu Leu Gly Ile Thr His
65 70 75 80
Ile Gly His Gln Val Val Pro Pro Met Ala Val Ser Lys Ala Lys Ala
85 90 95
Cys Gln Ala Ala Glu Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ala Leu Asn Lys Thr
100 105 110
Gln Tyr Ser Thr Asp Gly Trp Thr Leu Gln Gln Thr Ser Leu Glu Met
115 120 125
Trp Arg Ala Glu Pro Gln Lys Tyr Phe Lys Lys His Gly Tyr Thr Ile
130 135 140
Thr Val Gln Tyr Asp Asn Asp Lys Asn Asn Thr Met Asp Tyr Thr Asn
145 150 155 160
Trp Lys Glu Ile Tyr Leu Leu Gly Glu Cys Glu Cys Thr Ile Val Glu
165 170 175
Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Trp Cys Asp Gly Glu Lys
180 185 190
Ile Tyr Phe Val Lys Phe Ser Asn Asp Ala Lys Gln Tyr Cys Val Thr
195 200 205
Gly Val Trp Glu Val His Val Gly Gly Gln Val Ile Val Cys Pro Ala
210 215 220
Ser Val Ser Ser Asn Glu Val Ser Thr Thr Glu Thr Ala Val His Leu
225 230 235 240
Cys Thr Glu Thr Ser Lys Thr Ser Ala Val Ser Val Gly Ala Lys Asp
245 250 255
Thr His Leu Gln Pro Pro Gln Lys Arg Arg Arg Pro Asp Val Thr Asp
260 265 270
Ser Arg Asn Thr Lys Tyr Pro Asn Asn Leu Leu Arg Gly Gln Gln Ser
275 280 285
Val Asp Ser Thr Thr Arg Gly Leu Val Thr Ala Thr Glu Cys Thr Asn
290 295 300
Lys Gly Arg Val Ala His Thr Thr Cys Thr Ala Pro Ile Ile His Leu
305 310 315 320

```

Lys Gly Asp Pro Asn Ser Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Val Lys Thr  
 325 330 335  
 His Lys Ser Leu Tyr Val Gln Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser  
 340 345 350  
 Asn Glu Cys Thr Asn Asn Lys Leu Gly Ile Val Thr Ile Thr Tyr Ser  
 355 360 365  
 Asp Glu Thr Gln Arg Gln Gln Phe Leu Lys Thr Val Lys Ile Pro Asn  
 370 375 380  
 Thr Val Gln Val Ile Gln Gly Val Met Ser Leu Gly Leu Ser Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly  
 405 410 415  
 Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly  
 420 425 430  
 Glu Gln Val Gly Met Ser Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly  
 435 440 445  
 Thr Ser Lys Ser Tyr Val Arg Ser Leu  
 450 455

<210> 32

<211> 746

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido E1 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana de HPV-18

<400> 32

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Ala Asp Pro Glu  
 20 25 30  
 Gly Thr Asp Gly Glu Gly Thr Gly Cys Asn Gly Trp Phe Tyr Val Gln  
 35 40 45  
 Ala Ile Val Asp Lys Lys Thr Gly Asp Val Ile Ser Asp Asp Glu Asp  
 50 55 60  
 Glu Asn Ala Thr Asp Thr Gly Ser Asp Met Val Asp Phe Ile Asp Thr  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Thr Phe Cys Glu Gln Ala Glu Leu Glu Thr Ala Gln Ala Leu  
 85 90 95  
 Phe His Ala Gln Glu Val His Asn Asp Ala Gln Val Leu His Val Leu  
 100 105 110  
 Lys Arg Lys Phe Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asn Ser Pro Leu Gly Glu  
 115 120 125  
 Arg Leu Glu Val Asp Thr Glu Leu Ser Pro Arg Leu Gln Glu Ile Ser  
 130 135 140  
 Leu Asn Ser Gly Gln Lys Lys Ala Lys Arg Arg Leu Phe Thr Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Gly Tyr Gly Cys Ser Glu Val Glu Ala Thr Gln Ile Gln Val  
 165 170 175  
 Thr Thr Asn Gly Glu His Gly Gly Asn Val Cys Ser Gly Gly Ser Thr  
 180 185 190  
 Glu Ala Ile Asp Asn Gly Gly Thr Glu Gly Asn Asn Ser Ser Val Asp  
 195 200 205  
 Gly Thr Ser Asp Asn Ser Asn Ile Glu Asn Val Asn Pro Gln Cys Thr  
 210 215 220  
 Ile Ala Gln Leu Lys Asp Leu Leu Lys Val Asn Asn Lys Gln Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Met Leu Ala Val Phe Lys Asp Thr Tyr Gly Leu Ser Phe Thr Asp Leu

ES 2 370 674 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Arg | Asn | Phe | Lys | Ser | Asp | Lys | Thr | Thr | Cys | Thr | Asp | Trp | Val | Thr |
| Ala | Ile | Phe | 260 | Val | Asn | Pro | Thr | Ile | Ala | Glu | Gly | Phe | Lys | Thr | Leu |
| Ile | Gln | Pro | 275 | Ile | Leu | Tyr | Ala | His | Ile | Gln | Cys | Leu | Asp | Cys | Lys |
| Trp | Gly | Val | 290 | Ile | Leu | Ala | Leu | Leu | Arg | Tyr | Lys | Cys | Gly | Lys | Ser |
| 305 | Arg | Leu | Thr | Val | Ala | Lys | Gly | Leu | Ser | Thr | Leu | Leu | His | Val | Pro |
| Thr | Cys | Met | 340 | Ile | Gln | Pro | Pro | Lys | 330 | Leu | Arg | Ser | Ser | Val | Ala |
| Leu | Tyr | Trp | 355 | Tyr | Arg | Thr | Gly | Ile | Ser | Asn | Ile | Ser | Glu | Val | Met |
| Asp | Thr | Pro | 370 | Glu | Trp | Ile | Gln | Arg | Leu | Thr | Ile | Ile | Gln | His | Gly |
| Asp | Asp | Ser | 385 | Asn | Phe | Asp | Leu | Ser | Glu | Met | Val | Gln | Trp | Ala | Phe |
| Asn | Glu | Leu | 405 | Thr | Asp | Glu | Ser | Asp | Met | Ala | Phe | Glu | Tyr | Ala | Leu |
| Ala | Asp | Ser | 420 | Asn | Ser | Asn | Ala | Ala | Ala | Phe | Leu | Lys | Ser | Asn | Cys |
| Ala | Lys | Tyr | 435 | Leu | Lys | Asp | Cys | Ala | Thr | Met | Cys | Lys | His | Tyr | Arg |
| Ala | Gln | Lys | 450 | Arg | Gln | Met | Asn | Met | Ser | Gln | Trp | Ile | Arg | Phe | Arg |
| Ser | Lys | Ile | 465 | Asp | Glu | Gly | Gly | Asp | Trp | Arg | Pro | Ile | Val | Gln | Phe |
| Arg | Tyr | Gln | 485 | Gln | Ile | Glu | Phe | Ile | Thr | Phe | Leu | Gly | Ala | Leu | Lys |
| Phe | Leu | Lys | 500 | Gly | Thr | Pro | Lys | Lys | Asn | Cys | Leu | Val | Phe | Cys | Gly |
| Ala | Asn | Thr | 515 | Asp | Lys | Ser | Tyr | Phe | Gly | Met | Ser | Phe | Ile | His | Phe |
| Gln | Gly | Ala | 530 | Val | Ile | Ser | Phe | Val | Asn | Ser | Thr | Ser | His | Phe | Trp |
| Glu | Pro | Leu | 545 | Thr | Asp | Thr | Lys | Val | Ala | Met | Leu | Asp | Asp | Ala | Thr |
| Thr | Cys | Trp | 565 | Thr | Tyr | Phe | Asp | Thr | Tyr | Met | Arg | Asn | Ala | Leu | Thr |
| Asn | Pro | Ile | 580 | Ser | Ile | Asp | Arg | Lys | His | Lys | Pro | Leu | Ile | Gln | Leu |
| Cys | Pro | Pro | 595 | Ile | Leu | Leu | Thr | Thr | Asn | Ile | His | Pro | Ala | Lys | Asp |
| Arg | Trp | Pro | 610 | Tyr | Leu | Glu | Ser | Arg | Ile | Thr | Val | Phe | Glu | Phe | Pro |
| Ala | Phe | Pro | 625 | Phe | Asp | Lys | Asn | Gly | Asn | Pro | Val | Tyr | Glu | Ile | Asn |
| Lys | Asn | Trp | 645 | Lys | Cys | Phe | Phe | Glu | Arg | Thr | Trp | Ser | Arg | Leu | Asp |
| His | Glu | Glu | 660 | Glu | Glu | Asp | Ala | Asp | Thr | Glu | Gly | Asn | Pro | Phe | Gly |
| Phe | Lys | Leu | 675 | Arg | Ala | Gly | Gln | Asn | His | Arg | Pro | Leu | Gly | Leu | Ser |
| Thr | Ser | Ile | 690 | Val | Tyr | Ile | Leu | Ile | Ala | Val | Cys | Leu | Gly | Gly | Leu |
| Gly | Ile | Pro | 705 | Ala | Leu | Ile | Cys | Cys | Cys | Arg | Gly | Arg | Cys | Asn | Lys |
| Gly | Glu | Gln | 725 | Val | Gly | Met | Ser | Arg | Pro | Gly | Leu | Lys | Pro | Asp | Leu |
| Gly | Thr | Ser | 740 | Lys | Ser | Tyr | Val | Arg | Ser | Leu |     |     |     |     |     |

- 5      <210> 33  
       <211> 1362  
       <212> ADN  
       <213> secuencia artificial
- 10     <220>  
       <223> secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de HPV-18 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana (degenerada para reducir la homología con la secuencia que codifica E2 de HPV-16)
- <400> 33

# ES 2 370 674 T3

```

atggttcctc aggcctctct gtttgtacct cttctggttt ttccattgtg ttttgggaaa 60
ttccctattc agacaccgaa ggaaccctt tcggaacgat taagttgctg gcaagataag 120
atcatagacc actacgagaa cgacagtaaa gacatagaca gccaaatata gtactggcaa 180
craatacgtt gggcaaatgc aatattcttt gcagcaaggg aacatggcat acagacatta 240
aatcatcagg tagtcccagc ctataacatt tcgaaaagta aggcacataa agctgccgag 300
ctccaaatgg ccctacaagg ccttgcacaa agtcgataca aaaccgagga ttggactctg 360
caggacacat gcgaggaact atggaatata gaacctactc actgctttaa gaaaggtggc 420
caaaccgtac aagtatatat cgacggcaac aaagacaatt gtatgacctg ttagcatggg 480
gacagtgtgt attatatgac tgatgcagga acatgggaca aaaccgctac ctgtgtaagt 540
cacaggggat tgtactacgt aaaggagggg tacaacacgt tttatataga attcaaaagt 600
gaatgtgaga aqtatgggaa cacaggtacg tgggaggtac attttgggaa taatgtcatt 660
gattgtaatg actctatgtg cagtaccagt gacgacacgg tctccgctac tcagcttgtt 720
aaacagctac agcacacccc ctccaccgat tccagcacgg tgcctgtggg aaccgcaaaag 780
acctacggcc agacgtcggc tgctacacga cctggccact gtggactcgc ggagaagcag 840
cattgtggac ctgtcaaccc acttctcggg gcagctacac ctacaggcaa caacaagaga 900
cgaaaactct gcagtggtaa tacgacgcct ataatacact tgaagggaga cagaaacagt 960
ttgaagtgtc tacggtacag gttgcgaaaa catagcgacc actatagaga tatatcatcc 1020
acctggcact ggaccggtgc aggcaatgaa aaaacaggaa tactgactgt aacctaccat 1080
agcgaaacac aaagaacaaa attcttaaat actgttgcaa ttccagatag tgtacaaata 1140
ttggtgggat acatgacaat gtatgtatta ctgagtgcag gggccctgac tgccttgatg 1200
ttgataatit tcttgatgac atgttgtaga agagtcaatc gatcagaacc tacgcaacac 1260
aatctcagag ggacagggag ggaggtgtca gtcactcccc aaagcgggaa gatcatatct 1320
tcattgggaat cacacaagag tgggggtgag accagactgt ga 1362

```

<210> 34

5 <211> 1062

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido E2 de HPV-33 defectuoso en la replicación (secuencia degenerada)

<400> 34

```

atggaggaaa tatcagcacg cttgaatgca gtccaagaga aaattctaga tctttacgaa 60
gcagataaaa ctgatttacc atctcaaat gaacactgga aattgatacg catggcctgc 120
gctttattgt atacagccaa acagatgggc ttttcacatt tatgtcacca agtggtaacct 180
tctttgttag catccaaaac caaagcgttt caagtagcgg aactacagat ggcattagag 240
acattaagta aatcacagta tagcacaaag caatggacgt tgcaacagac aagcttagag 300
gtttggcttt gtgaaccacc aaaatgtttt aaaaagcaag gagaaacagt aactgtgcaa 360
tatgacaatg acaaaaaaaa taccatggac tatactaact ggggtgaaat atacattata 420
gaggaagata catgtactat ggttacaggg aaatagatt atataggtat gtattacata 480
cataactgtg aaaagggtata ctttaaatat tttaaggagg atgctgcaa atactctaaa 540
acacaaatgt gggaagtcca tgtaggtggc caggttattg tttgccctac gtctatatct 600
agcaatcaaa tatccactac tgagactgct gacatacaga cagacaacga taaccgacca 660
ccacaagcag cggccaaaac acgacgacct gcagacacta ctgacaccgc ccagcccctt 720
acaaagctgt tctgtgcaga ccccgcttg gataatagaa cagcacgtac agcaactaac 780
tgacaaaata agcagcggac tgtgtgtagt tctaacgttg caccaatagt gcatttgaaa 840
ggcgaatcaa atagcttaaa gtgtttgaga tacagattaa aaccttataa agagtgttac 900
agtcttatgt cttcaacttg gcaactggac agtgacaaca aaaatagtaa aaatggcata 960
gtaaccgtga catttgtaac tgaacagcaa caacaaatgt tcttgggtac cgtaaagata 1020
cctcctactg tgcagataag taccggattc atgaccttat aa 1062

```

<210> 35

<211> 1326

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de HPV-33 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana (SS-33E2\*-TMR) (secuencia degenerada)

<400> 35

## ES 2 370 674 T3

```

atggtaccgc aagccctgct attcgtaacct ttattgggtct tccccctctg tttcggttaag 60
tttcctatag aggaaatata agcacgcttg aatgcagtc aagagaaaat tctagatctt 120
tacgaagcag ataaaactga tttaccatct caaatgaac actggaatt gatacgcatg 180
gcctgcgctt tattgtatag agccaaacag atgggctttt cacatttatg tcaccaagtg 240
gtaccttctt tgttagcatc caaaaccaa gcgtttcaag tagcggaact acagatggca 300
ttagagacat taagtaaatc acagtatagc acaagccaat ggacgttgca acagacaagc 360
ttagaggttt ggctttgtga accaccaaa tgttttaaaa agcaaggaga aacagtaact 420
gtgcaalatg acaatgacaa aaaaaatacc atggactata ctaactggg tgaaatatac 480
attatagagg aagatacatg tactatgggt acagggaaa tagattatat aggtatgtat 540
tacatacata actgtgaaaa ggtatacttt aaatatatta aggaggtatg tgccaaatag 600
tctaaaacac aaatgtggga agtccatgta ggtggccagg ttattgtttg ccctacgtct 660
atatctagca atcaaatatc cactactgag actgctgaca tacagacaga caacgataac 720
cgaccaccac aagcagcggc caaacgacga cgacctgcag acactactga caccgcccag 780
ccctttacaa agctgttctg tgcagacccc gccttgata atagaacagc acgtacagca 840
tctaactgca caaataagca gcggactgtg tgtagttcta acggttcacc aatagtgcac 900
ttgaaaggcg aatcaaatag cttaaatgtt ttgagataga gattaaaacc ttataaagag 960
ttgtacagtt ctatgtcttc aacttggcac tggactagt acaacaaaa tagtaaaaat 1020
ggcatagtaa ccgtgacatt tgtactgaa cagcaacaac aaatgttctt gggtaccgta 1080
aagatacctc ctactgtgca gataagtacc ggattcatga ccttatacgt actgctatcg 1140
gcaggcacgt tgatcgactc aatgcttata atcttcctaa taacctgctg caagcgggtt 1200
gataggcccg aaagtaccca aaggtccttg agaggtaccg gacgcaacgt atcggtaacg 1260
tcgcaaacgc gcaagtctat tagcagttgg gagtcgcaca aatcaggtgg agagaccgcg 1320
ctgtga 1326

```

5 <210> 36  
 <211> 1107  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 defectuoso en la replicación de HPV-53 ((52degE2\*)  
 (secuencia degenerada)

<400> 36

15

```

atggaatcga taccggcagc gttaaacgct gtgcaggaaa agataactga tctatatgag 60
gctgacagca atgatctaaa cgcacaaatc gagcattgga agttgactcg aatggcttgt 120
gttttgtttt ataaagcaa ggaactggga ataactcata taggccatca agtagtgctt 180
ccaatggcag tgtctaaggc aaaggcctgc caagccgag agcttcaatt ggctttggag 240
gcattgaaca aaactcaata cagtacagat ggctggacct tacagcaaac aagtctagaa 300
atgtggcggtg cagagccaca aaaatacttc aagaagcagc ggtacacaat aacagtccaa 360
tacgataatg ataaaaacaa cactatggat tacacaaatt ggaaggaaat ttatttactt 420
ggtgagtgtg aatgcacaat tgtagaagga caagtggatt actatgggtt atactattgg 480
tgtgatggag aaaaaatcta ttctgtaaaa tttagtaacg acgcaaaagca atatttgtta 540
acaggagtct gggagggtga cgtggcggt caagtaatcg tgtgtccagc atcggtatca 600
agtaacgaggt ttctactac agaaacagct gtccacctat gcaccgaaac ctccaagacc 660
tccgcagtggt ccgtgggtgc caaagacaca cactacaac caccacagaa ggcacgtcga 720
ccagatgtca cagattccag aaacaccaag taccccaaca accttttgcg gggacaacaa 780
tccgttgaca gcactacacg gggactcgta actgccactg agtgactaa taaaggtcgg 840
gtgacacata caactgttac tgctcctatt attcacctaa agggtagacc caacagcttg 900
aaatgcctaa ggtatagggt aaaaacacat aaaagttaa atgttcaaat tcatctacg 960
tggcattgga cgagtaatga atgtacaaat aataaactag gatttgtaac aataacgtac 1020
agtgatgaga cacagcgtca acagttttaa aaaactgtca aaatccaaa tacgtccaa 1080
gttatacaag gtgtcatgtc attgtaa 1107

```

20 <210> 37  
 <211> 1374  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de HPV-52 defectuoso en la replicación y  
 presentado en la membrana SS-52degE2\*(secuencia degenerada)

<400> 37

|             |             |            |            |             |            |      |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| atgggtctca  | agggtgaacgt | ctctgccata | ttcatggcag | tactgttaac  | tctccaaaca | 60   |
| cccaccgggc  | aaatccattg  | gggcgaatcg | ataccggcac | ggttaaacyc  | tgtgcaggaa | 120  |
| aagatactcg  | atctatatga  | ggctgacagc | aatgatctaa | acgcacaaat  | cgagcattgg | 180  |
| aagttgactc  | gaatggcttg  | tgttttgttt | tataaagcaa | aggaactggg  | aataactcat | 240  |
| ataggccatc  | aagtagtgcc  | tccaatggca | gtgtctaagg | caaaggcctg  | ccaagccgca | 300  |
| gagcttcaat  | tggctttgga  | ggcattgaac | aaaactcaat | acagtacaga  | tggctggacc | 360  |
| ttacagcaaa  | caagtctaga  | aatgtggcgt | gcagagccac | aaaaatactt  | caagaagcac | 420  |
| gggtacacaa  | taacagtcga  | atacgataat | gataaaaaca | acactatgga  | ttacacaaat | 480  |
| tgggaaggaaa | tttatcttact | tgttgagtg  | gaatgcacaa | ttgtagaagg  | acaagtggat | 540  |
| tactatgggt  | tatactattg  | gtgtgatgga | gaaaaaatct | atttcgtaaa  | atttagtaac | 600  |
| gacgcaaagc  | aatatgtgtg  | aacaggagtc | tgggagggtg | acgtgggcgg  | tcaagtaatc | 660  |
| gtgtgtccag  | catcggtatc  | aagtaacgag | gtttctacta | cagaacacgc  | tgccaccta  | 720  |
| tgcaccgaaa  | cctccaagac  | ctccgcagtg | tccgtgggtg | ccaaagacac  | acacctacaa | 780  |
| ccaccacaga  | agcgagctcg  | accagatgtc | acagattcca | gaaacaccaa  | gtaccccaac | 840  |
| aaccttttgc  | ggggacaaca  | atccgttgac | agcactacac | ggggactcgt  | aactgccact | 900  |
| gagtgcacta  | ataaaggctg  | ggttgacac  | acaacttgta | ctgctcctat  | tattcaccta | 960  |
| aagggtgacc  | ccaacagctt  | qaaatgccta | aggatatagg | taaaaacaca  | taaaagttaa | 1020 |
| tatgtttcaaa | tttcatctac  | gtggcattgg | acgagtaagt | aattgtacaaa | taataaacta | 1080 |
| ggtattgtaa  | caataacgta  | cagtgtatg  | acacagcgtc | aacagttttt  | aaaaactgtc | 1140 |
| aaaatcccaa  | ataccgtcca  | agttatacaa | ggtgtcatgt | cattgggttt  | atcgagcact | 1200 |
| agcatagtct  | acatcctgat  | tgcagtgtgt | cttggagggt | tgatagggat  | ccccgcttta | 1260 |
| atatgttctc  | gcagggggag  | ttgtaacaaa | aagggaagac | aagtgtgtat  | gtcaagacca | 1320 |
| ggcctaaagc  | ctgatcttac  | gggaacatca | aaatcctatg | taaggctcgt  | ctga       | 1374 |

<210> 38

<211> 2241

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un E1 de HPV-18 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana (SS-18E1\*-TMF) (degenerada para reducir la homología con la secuencia de nucleótidos de HPV-16 que codifica el E1)

<400> 38

|             |             |            |             |            |            |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| atgggtctca  | agggtgaacgt | ctctgccata | ttcatggcag  | tactgttaac | tctccaaaca | 60   |
| cccaccgggc  | aaatccattg  | gggcgcagac | ccagaaggca  | cagacggaga | aggcacgggt | 120  |
| tgcacacggc  | ggttctactg  | acaagctatt | gtagacaaga  | agaccggaga | tgtaatttct | 180  |
| gacgatgagg  | acgagaatgc  | aacagacaca | gggtcggata  | tggttgactt | cattgatata | 240  |
| caagggaacat | tttgtgaaca  | agccgagcta | gaaactgtct  | aggcattggt | ccatgcgcag | 300  |
| gaggtccaca  | atgatgcaca  | agtgttgcat | gttttaaagc  | ggaagtgtgc | aggaggcagc | 360  |
| acagaaaaca  | gtccatttag  | ggagcggctg | gaggtggata  | cagagttaag | cccacggtta | 420  |
| caagaaatat  | ctttaaatag  | tgggcagaaa | aaggctaaga  | ggcggctggt | tacaatatca | 480  |
| gatagtggct  | acggctgttc  | tgaggtggaa | gcaacacaga  | ttcaggtaac | tacaaatggc | 540  |
| gaacatggcg  | gcaatgtatg  | cagtggcggc | agtagcgagg  | ctatagacaa | cggaggcaca | 600  |
| gagggcaaca  | acagcagtg   | agacggtaca | agcgacaata  | gcaatataga | aaatgtaaat | 660  |
| ccacaatgta  | ccatagcaca  | attaaaagac | ttgttaaaag  | taaaacaata | acaaggagct | 720  |
| atgcttgacg  | tattcaagga  | cacatatggg | ctatcattta  | cagatttagt | tagaaatttc | 780  |
| aagagtgcga  | aaaccacatg  | tacagactgg | gttacagcta  | tattcggagt | aaacccaaca | 840  |
| atcgacagaag | gatttaagac  | tctaatacac | ccatttatat  | tgtatgccc  | tatacaatgt | 900  |
| ctagactgta  | agtggtgtgt  | attaatatta | gccctgttgc  | gttacaagtg | cgttaagagt | 960  |
| agactaacag  | ttgtctaaag  | tttaagtacg | ttgttacacg  | tacctgaac  | ttgcatgtta | 1020 |
| attcaaccac  | ctaagttacg  | aagtagtgtt | gctgcactat  | actggtacag | aactggaatt | 1080 |
| tctaaccata  | gcgaggtaat  | gggtgacaca | cctgagtgga  | ttcagagact | tactattata | 1140 |
| cagcatggaa  | tagacgatag  | caatttcgat | ttgtcagaaa  | tggttcagtg | ggcatttgac | 1200 |
| aacgagctga  | cagatgaaag  | cgatatggca | tttgaatacg  | ccttattagc | tgacagcaac | 1260 |
| agcaacgcag  | ctgcattttt  | aaagagcaat | tgccaagcta  | aatattttaa | agactgtgcc | 1320 |
| actatgtgca  | aacactatag  | gcgtgcccag | aaacgcacaga | tgaatatgtc | acagtggatt | 1380 |
| cgatttaggt  | gttcaaaaat  | agacgaagg  | ggagactgga  | gaccaatagt | gcaattcctg | 1440 |
| cgataccaac  | aaatagaatt  | cataacattc | ttaggagcct  | tgaatcattt | cttaaaagga | 1500 |
| acccccaaag  | agaactgttt  | agtattttgt | ggaccagcaa  | atactgacaa | gtcatatttc | 1560 |
| ggaatgagct  | ttatacactt  | tatacaagga | gcagttatat  | cattcgtgaa | ctccactagt | 1620 |
| cactttctgc  | tggaaaccgt  | aacagacact | aaggtggcca  | tgctagacga | cgcacgacc  | 1680 |
| acgtgctgga  | catactttga  | tacctatatg | aggaacgcgt  | tagacggcaa | tccaataagt | 1740 |
| attgatagaa  | aacacaaacc  | tttaatacac | cttaagtgtc  | cgccaatact | actaaccaca | 1800 |
| aatatacatc  | cagcaaaagg  | taatagatgg | ccatacttag  | aaagtagaat | aacagtattt | 1860 |
| gaatttccaa  | gttcattccc  | gttcgataaa | aatggcaacc  | ctgtatacga | aataaacgac | 1920 |
| aaaaatttga  | agtgtttctt  | tgaagaagaa | tggccaaggt  | tagatttaca | tgaagaagaa | 1980 |
| gaagatgctg  | atacagaggg  | taatccattt | ggtactttca  | aattacgagc | tggacagaat | 2040 |
| cacaggcctc  | ttggttttat  | gagcactagc | atagtctaca  | tctgtattgc | agtggtctct | 2100 |
| ggaggggtga  | tagggatccc  | cgctttaata | tgttgcgtca  | gggggcgttg | taacaaaaag | 2160 |
| ggagaacaag  | ttggtatgtc  | aagaccaggc | ctaaagcctg  | atcttacggg | aacatcaaaa | 2220 |
| tcctatgtaa  | ggtcgtctcg  | a          |             |            |            | 2241 |

<210> 39

# ES 2 370 674 T3

|    |                                                                                                |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <211> 33                                                                                       |    |
|    | <212> ADN                                                                                      |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                     |    |
| 5  | <220>                                                                                          |    |
|    | <223> cebador oTG15315 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-6E1*deg-TMF       |    |
|    | <400> 39                                                                                       |    |
| 10 | ggggagatct atgggtctca aggtgaacgt ctc                                                           | 33 |
|    | <210> 40                                                                                       |    |
|    | <211> 39                                                                                       |    |
|    | <212> ADN                                                                                      |    |
| 15 | <213> secuencia artificial                                                                     |    |
|    | <220>                                                                                          |    |
|    | <223> primer cebador oTG17881 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E1*deg-TMF |    |
| 20 | <400> 40                                                                                       |    |
|    | gtgccttctg ggtctgcgcc ccaatggatt tgaccggtg                                                     | 39 |
| 25 | <210> 41                                                                                       |    |
|    | <211> 37                                                                                       |    |
|    | <212> ADN                                                                                      |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                     |    |
| 30 | <220>                                                                                          |    |
|    | <223> primer cebador oTG17882 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E1*deg-TMF |    |
|    | <400> 41                                                                                       |    |
| 35 | ggtcaaattc attggggcgc agaccagaa ggcacag                                                        | 37 |
|    | <210> 42                                                                                       |    |
|    | <211> 42                                                                                       |    |
| 40 | <212> ADN                                                                                      |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                     |    |
|    | <220>                                                                                          |    |
|    | <223> primer cebador oTG17883 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E1*deg-TMF |    |
| 45 | <400> 42                                                                                       |    |
|    | cagaatcaca ggcctcttgg ttatcgagc actagcatag tc                                                  | 42 |
| 50 | <210> 43                                                                                       |    |
|    | <211> 39                                                                                       |    |
|    | <212> ADN                                                                                      |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                     |    |
| 55 | <220>                                                                                          |    |
|    | <223> primer cebador oTG17884 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E1*deg-TMF |    |
| 60 | <400> 43                                                                                       |    |
|    | gctagtgtc gataaaccaa gaggcctgtg attctgtcc                                                      | 39 |
|    | <210> 44                                                                                       |    |
| 65 | <211> 32                                                                                       |    |
|    | <212> ADN                                                                                      |    |

|    |                                                                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <213> secuencia artificial                                                                            |    |
|    | <220>                                                                                                 |    |
| 5  | <223> cebador sentido oTG17885 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E2*deg-TMF       |    |
|    | <400> 44                                                                                              |    |
| 10 | gggggcgggcc gctcagagcg accttacata gg                                                                  | 32 |
|    | <210> 45                                                                                              |    |
|    | <211> 31                                                                                              |    |
|    | <212> ADN                                                                                             |    |
| 15 | <213> secuencia artificial                                                                            |    |
|    | <220>                                                                                                 |    |
|    | <223> cebador sentido oTG17875 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E2*deg-TMF       |    |
|    | <400> 45                                                                                              |    |
| 20 | ggggagatct atggttcctc aggctctcct g                                                                    | 31 |
|    | <210> 46                                                                                              |    |
|    | <211> 39                                                                                              |    |
| 25 | <212> ADN                                                                                             |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                            |    |
|    | <220>                                                                                                 |    |
| 30 | <223> cebador sentido oTG17876 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E2*deg-TMF       |    |
|    | <400> 46                                                                                              |    |
| 35 | gttttgggaa attccctatt cagacaccga aggaaaccc                                                            | 39 |
|    | <210> 47                                                                                              |    |
|    | <211> 43                                                                                              |    |
|    | <212> ADN                                                                                             |    |
| 40 | <213> secuencia artificial                                                                            |    |
|    | <220>                                                                                                 |    |
|    | <223> cebador sentido oTG17877 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E2*deg-TMF       |    |
| 45 | <400> 47                                                                                              |    |
|    | gtttcctcg gtgtctgaat agggaatttc ccaaaacaca atg                                                        | 43 |
|    | <210> 48                                                                                              |    |
| 50 | <211> 39                                                                                              |    |
|    | <212> ADN                                                                                             |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                            |    |
|    | <220>                                                                                                 |    |
| 55 | <223> sense cebador sentido oTG17878 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E2*deg-TMF |    |
|    | <400> 48                                                                                              |    |
| 60 | gtgggataca tgacaatgta tgtattactg agtgcaggg                                                            | 39 |
|    | <210> 49                                                                                              |    |
|    | <211> 38                                                                                              |    |
|    | <212> ADN                                                                                             |    |
| 65 | <213> secuencia artificial                                                                            |    |
|    | <220>                                                                                                 |    |

# ES 2 370 674 T3

|    |                                                                                                 |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <223> cebador sentido oTG17879 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E2*deg-TMF |    |
|    | <400> 49                                                                                        |    |
| 5  | ctgcactcag taatacatatc attgtcatgt atcccacc                                                      | 38 |
|    | <210> 50                                                                                        |    |
|    | <211> 29                                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                                       |    |
| 10 | <213> secuencia artificial                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                           |    |
|    | <223> cebador sentido oTG17880 para reconstituir la secuencia que codifica HPV-18 SS-E2*deg-TMF |    |
|    | <400> 50                                                                                        |    |
| 15 | gggggcgggcc gctcacagtc tggctcac                                                                 | 29 |
|    | <210> 51                                                                                        |    |
|    | <211> 36                                                                                        |    |
| 20 | <212> ADN                                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18962 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR                 |    |
| 25 | <400> 51                                                                                        |    |
|    | cccaaaggat ccaccatggt accgcaagcc ctgcta                                                         | 36 |
| 30 | <210> 52                                                                                        |    |
|    | <211> 52                                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                      |    |
| 35 | <220>                                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18963 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR                 |    |
|    | <400> 52                                                                                        |    |
| 40 | ttccctctg ttccggtgtaag ttctctatag aggaaatc agcacgcttg aa                                        | 52 |
|    | <210> 53                                                                                        |    |
|    | <211> 52                                                                                        |    |
| 45 | <212> ADN                                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18964 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR                 |    |
| 50 | <400> 53                                                                                        |    |
|    | ttcaagcgtg ctgatattc ctctatagga aacttaccga aacagagggg aa                                        | 52 |
| 55 | <210> 54                                                                                        |    |
|    | <211> 49                                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                                      |    |
| 60 | <220>                                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18965 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR                 |    |
| 65 | <400> 54                                                                                        |    |

|    |                                                                                 |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | gataagtacc ggattcatga ccttatacgt actgctatcg gcaggcacg                           | 49 |
|    | <210> 55                                                                        |    |
|    | <211> 49                                                                        |    |
| 5  | <212> ADN                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                      |    |
|    | <220>                                                                           |    |
| 10 | <223> cebador oTG18966 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
|    | <400> 55                                                                        |    |
|    | cgtgcctgcc gatagcagta cgtataaggt catgaatccg gtacttatc                           | 49 |
| 15 | <210> 56                                                                        |    |
|    | <211> 56                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                      |    |
| 20 | <220>                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18967 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
| 25 | <400> 56                                                                        |    |
|    | aaaaccccg c atgcgcggcc gcaagctatc acaggcgggt ctctccacct gatttg                  | 56 |
|    | <210> 57                                                                        |    |
| 30 | <211> 37                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                      |    |
|    | <220>                                                                           |    |
| 35 | <223> cebador oTG18968 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
|    | <400> 57                                                                        |    |
| 40 | aaacccgaga tctaccatgg gtctcaaggt gaacgtc                                        | 37 |
|    | <210> 58                                                                        |    |
|    | <211> 46                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                       |    |
| 45 | <213> secuencia artificial                                                      |    |
|    | <220>                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18969 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
| 50 | <400> 58                                                                        |    |
|    | cccaccggtc aaatccattg gggcgaatcg ataccggcac gggttaa                             | 46 |
| 55 | <210> 59                                                                        |    |
|    | <211> 46                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                      |    |
| 60 | <220>                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18970 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
|    | <400> 59                                                                        |    |
| 65 | ttaaccgtgc cggatcgat tcgcccacat ggatttgacc ggtggg                               | 46 |

## ES 2 370 674 T3

|    |                                                                                 |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <210> 60                                                                        |    |
|    | <211> 43                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                       |    |
| 5  | <213> secuencia artificial                                                      |    |
|    | <220>                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18971 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
| 10 | <400> 60                                                                        |    |
|    | gttatacaag gtgtcatgtc attgggttta tcgagcacta gca                                 | 43 |
| 15 | <210> 61                                                                        |    |
|    | <211> 43                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                      |    |
| 20 | <220>                                                                           |    |
|    | <223> cebador oTG18972 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
| 25 | <400> 61                                                                        |    |
|    | tgctagtgtc cgataaacc aatgacatga cacctgtat aac                                   | 43 |
| 30 | <210> 62                                                                        |    |
|    | <211> 53                                                                        |    |
|    | <212> ADN                                                                       |    |
|    | <213> secuencia artificial                                                      |    |
|    | <220>                                                                           |    |
| 35 | <223> cebador oTG18973 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*-TMR |    |
|    | <400> 62                                                                        |    |
| 40 | aagcttgcta gccaccggtg gggccgcggc cgctcagagc gaccttacat agg                      | 53 |

## REIVINDICACIONES

1. Vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos dos polipéptidos E2 de papilomavirus, en el que dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2 no comprenden una porción de 40 o más nucleótidos contiguos que muestran un porcentaje de identidad de 75% o superior a 75% entre dos cualesquiera de dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de E2.
2. Vector según la reivindicación 1, en el que dicha(s) molécula(s) de ácidos nucleicos codificante(s) de E2 codifica(n) un polipéptido E2 originado a partir de un HR-HPV seleccionado de entre el grupo constituido por HPV-16, HPV-18, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-70 y HPV-85, originado preferentemente a partir de HPV-16, HPV-18, HPV-33 o HPV-52 o cualquier combinación de los mismos.
3. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dichas moléculas de ácidos nucleicos se modifican de manera que codifiquen un polipéptido E2 defectuoso para por lo menos una actividad de activación de la replicación y/o de la transcripción.
4. Vector según la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido E2 se origina a partir de HPV-16 y comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº 1, excepto en que por lo menos el residuo Glu en la posición 39 (E39) y/o el residuo Ile en la posición 73 (I73) se sustituye(n) por cualquier residuo aminoácido aparte de Glu e Ile en las posiciones respectivas 39 y 73, preferentemente con un residuo de Ala.
5. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas moléculas de ácidos nucleicos se modifican de manera que codifiquen un polipéptido E2 presentado en la membrana.
6. Vector según la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido E2 presentado en la membrana se modificó mediante fusión de dicho polipéptido E2 de papilomavirus con una secuencia secretora y de anclaje a la membrana, en el que dichas secuencias secretoras y/o de anclaje a la membrana se originan preferentemente a partir de la glucoproteína de virus de la rabia, la glucoproteína de cubierta del virus VIH o la proteína F del virus del sarampión o son sintéticas.
7. Vector según la reivindicación 6, en el que dicha molécula de ácidos nucleicos codifica un polipéptido E2 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2.
8. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho vector comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos dos polipéptidos E2 originados a partir de diferentes genotipos de papilomavirus.
9. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho vector se selecciona de entre el grupo constituido por:
  - un vector que comprende (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16 y que comprende además (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18;
  - un vector que comprende (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18, e (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-33;
  - un vector que comprende (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18, e (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-52;
  - un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-33, e (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-52;
  - un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18, (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-33, e (iv) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-52;
  - un vector que comprende: (i) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-16, (ii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E1 de HPV-16, (iii) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 de HPV-18, e (iv) una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E1 de HPV-18;

- un vector que comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos E1, E2, E6 y E7 de HPV-16, y los polipéptidos E1, E2, E6 y E7 de HPV-18.

- 5 10. Vector según la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido E2 de HPV-16 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2; y/o dicho polipéptido E2 de HPV-18 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 29; y/o dicho polipéptido E2 de HPV-33 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 30, y/o dicho polipéptido E2 de HPV-52 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 31.
- 10 11. Vector según la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho polipéptido E1 de HPV-16 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 3, y/o dicho polipéptido E1 de HPV-18 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 32; y/o dicho polipéptido E6 de HPV-16 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4; y/o dicho polipéptido E7 de HPV-16 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 5.
- 15 12. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-16 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 8 y/o dicha molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-18 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 33; y/o dicha molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-33 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 34 o SEC ID nº 35; y/o dicha molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E2 de HPV-52 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 36 o SEC ID nº 37; y/o dicha molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E1 de HPV-16 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 7 y/o dicha molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido E1 de HPV-18 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 38.
- 20 25 13. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho vector es un vector poxvírico generado a partir de un poxvirus del canario, un poxvirus aviar o un virus Vaccinia, preferentemente un virus Vaccinia seleccionado de entre la cepa Copenhagen, la cepa Wyeth, NYVAC o la cepa Ankara modificada (MVA).
- 30 14. Vector según la reivindicación 13, en el que dicho vector vírico es a) derivado de un virus Vaccinia Copenhagen y en el que dicha molécula de ácidos nucleicos se inserta en el gen timidina cinasa, o b) derivado de un virus Vaccinia MVA y en el que dicha molécula de ácidos nucleicos se inserta en la delección III.
- 35 15. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que dicha(s) molécula(s) de ácidos nucleicos codificante(s) de E2 y/o de E7 se sitúa(n) bajo el promotor H5R de Vaccinia y molécula(s) de ácidos nucleicos codificante(s) de E1 y/o de E6 bajo el control del promotor p7.5K.
16. Partícula vírica infecciosa que comprende el vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 40 17. Composición que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o partícula vírica infecciosa según la reivindicación 16 o cualquier combinación de las mismas, preferentemente formulada en una forma adecuada para la inyección, en particular mediante la administración intramuscular o subcutánea.
- 45 18. Utilización de un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, una partícula vírica infecciosa según la reivindicación 16, o una composición según la reivindicación 17, en la preparación de un fármaco para el tratamiento de un organismo huésped que sufre una infección persistente por papilomavirus causada por por lo menos un papilomavirus, preferentemente por por lo menos un HR-HPV.
- 50 19. Utilización según la reivindicación 18, para el tratamiento de un organismo huésped que sufre una infección causada por por lo menos uno de entre HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 y HPV58, en la que dicho vector comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 originado a partir de HPV-16.
- 55 20. Utilización según la reivindicación 18, para el tratamiento de un organismo huésped que sufre una infección causada por por lo menos uno de entre HPV-18, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70 y HPV-85, en la que dicho vector comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido E2 originado a partir de HPV-18.
- 60 21. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en la que el fármaco debe administrarse en una primera serie de administraciones realizada secuencialmente dentro de un periodo de tiempo comprendido entre unos pocos días y 4 semanas, seguido de una segunda serie de administraciones realizada en uno a 6 meses siguientes a la última administración de la primera serie, comprendiendo la primera serie de administraciones preferentemente tres administraciones secuenciales a intervalos semanales y comprendiendo la segunda serie una administración en 5 ó 6 meses siguientes a la primera serie.
- 65 22. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en la que dicho fármaco está destinado a la utilización a) para proporcionar una respuesta antivírica contra por lo menos uno de los papilomavirus infecciosos, o

b) para inducir o activar una respuesta inmunológica en un organismo animal o humano.

- 5 23. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, una partícula vírica infecciosa según la reivindicación 16 o una composición según la reivindicación 17, para la utilización en a) el tratamiento de una infección persistente por papilomavirus en un organismo animal o humano, b) la inducción o activación de una respuesta inmunológica en un organismo animal o humano, o c) la provisión de una respuesta antivírica en un organismo animal o humano.

Figura 1

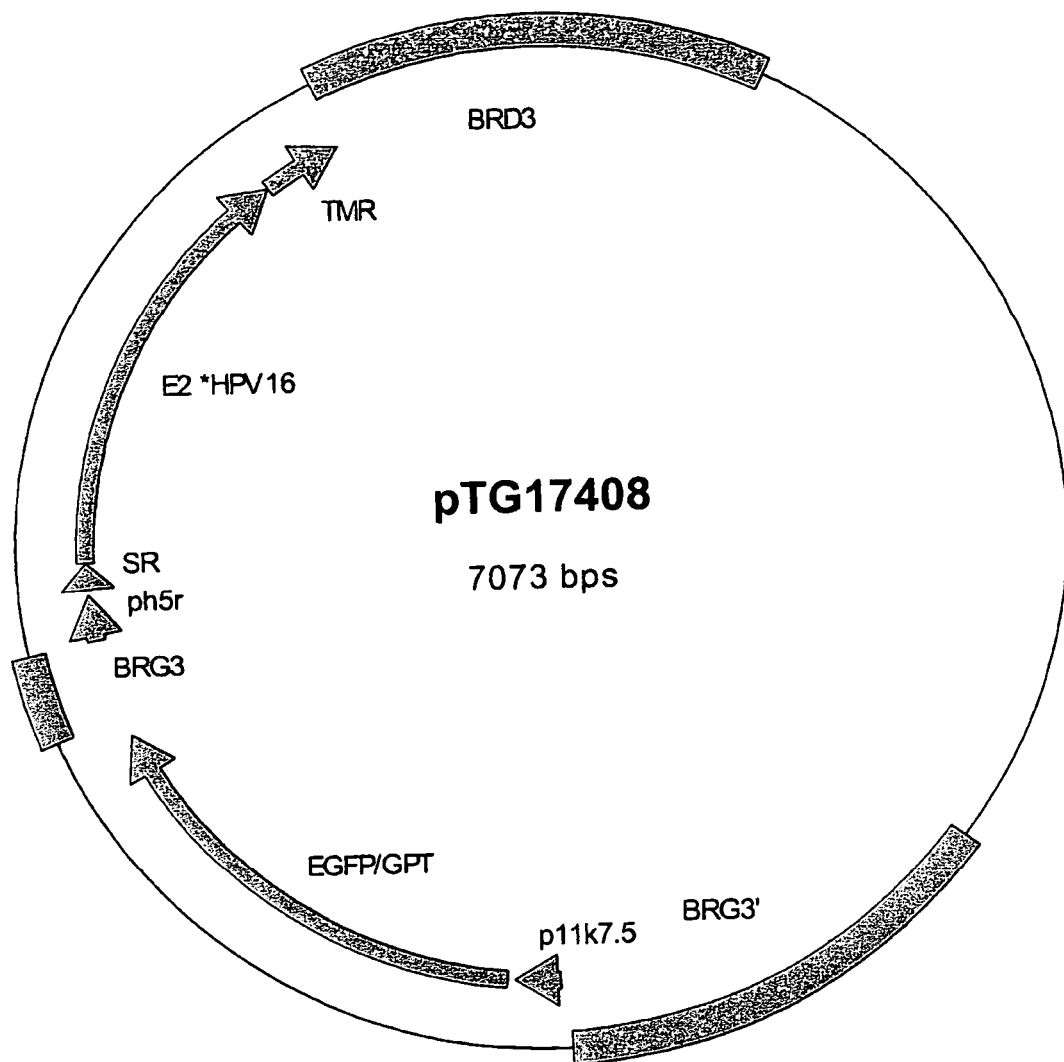
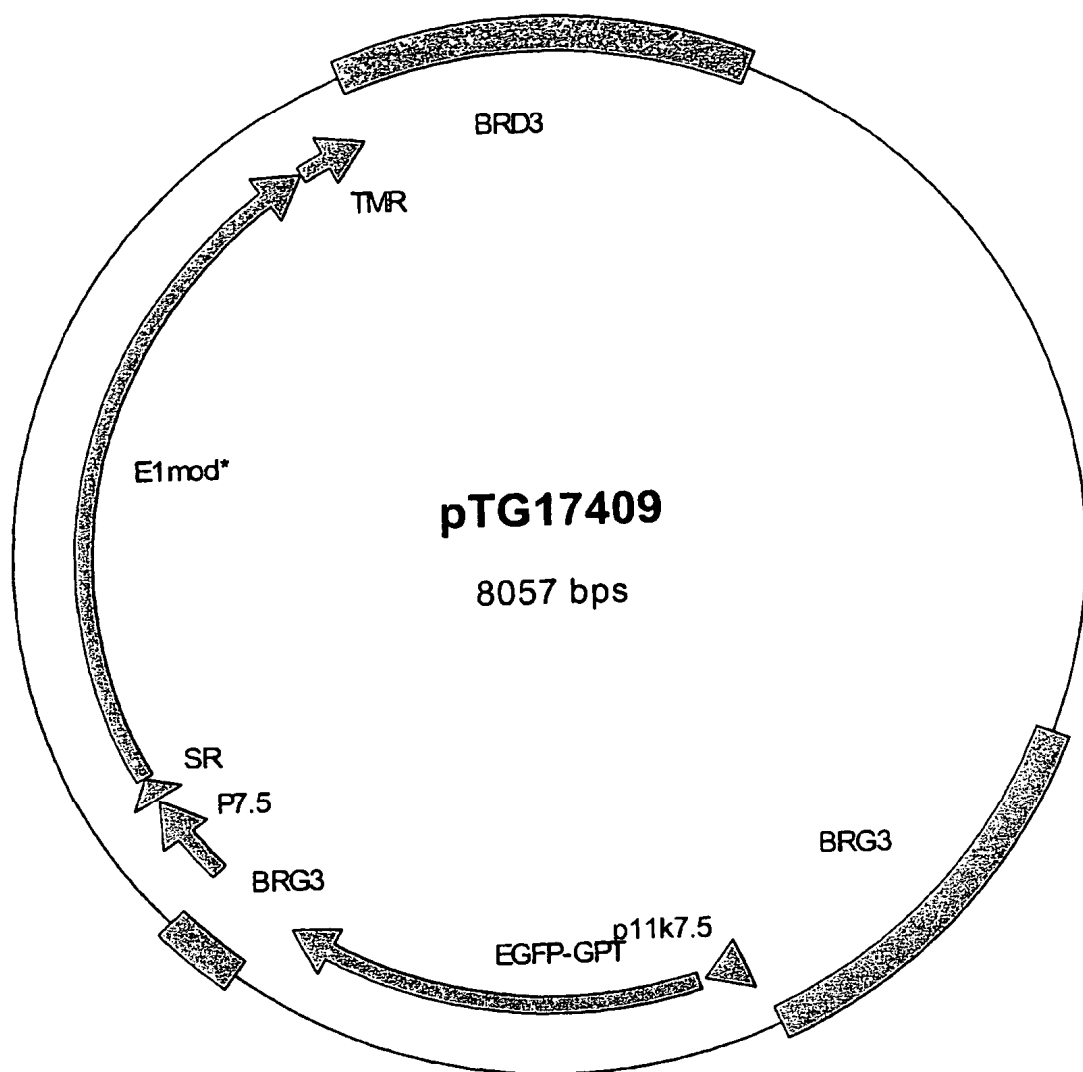


Figura 2



**Figura 3**  
Células secretadoras de IFN $\gamma$  por cada  $1 \times 10^6$  esplenocitos

