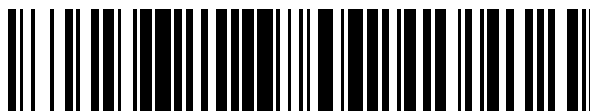


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 803**

51 Int. Cl.:

C12N 15/37	(2006.01)	C12N 15/33	(2006.01)
A61K 39/12	(2006.01)	C12N 15/37	(2006.01)
C07K 16/08	(2006.01)		
C07K 14/025	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61P 31/18	(2006.01)		
C07K 14/025	(2006.01)		
C07K 14/16	(2006.01)		
C12N 15/12	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00938875 .2**
- 96 Fecha de presentación: **31.05.2000**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1183368**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.2002**

54 Título: **Fragmentos proteicos poliepitópicos de las proteínas E6 y E7 de HPV , su obtencion y sus utilizaciones particularmente en vacunación**

30 Prioridad:
03.06.1999 FR 9907012

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.08.2012

73 Titular/es:
**ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS
3 AVENUE VICTORIA
75100 PARIS, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es:
**CHOPPIN, Jeannine;
BOURGAULT VILLADA, Isabelle;
GUILLET, Jean-Gérard;
CONNAN, Francine y
FERRIES, Estelle**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 386 803 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos proteicos poliepitópicos de las proteínas E6 y E7 de HPV, su obtención y sus utilidades particularmente en vacunación

- 5
- [0001] La presente invención se refiere a fragmentos proteicos poliepitópicos, tales como aquellos de la proteína E6 de los papillomavirus humanos, su procedimiento de obtención, y sus utilidades, particularmente en el ámbito de la vacunación terapéutica o preventiva.
- 10
- [0002] La invención tiene de una forma más particular como objetivo la utilización de fragmentos poliepitópicos de una proteína determinada para la preparación de medicamentos destinados a la prevención o al tratamiento de patologías en las cuales dicha proteína se reconoce por el sistema inmunitario celular.
- 15
- [0003] Ventajosamente, dichos fragmentos poliepitópicos son tales que su aminoácido N-terminal corresponde al aminoácido N-terminal del epítipo situado en sentido ascendente de uno o varios otros epítipos de una región poliepitópica de dicha proteína, y su aminoácido C-terminal corresponde al aminoácido C-terminal del epítipo situado en sentido descendente del o de los epítipos anteriormente mencionados de dicha región poliepitópica.
- 20
- [0004] De este modo, los fragmentos proteicos poliepitópicos anteriormente mencionados de la presente invención corresponden ventajosamente a las regiones poliepitópicas de una proteína determinada, a saber a las regiones que contienen varios epítipos reconocidos por las células T en asociación con las diferentes moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), dichas regiones estando seleccionadas entre aquellas que tienen la característica de ser degradadas in vitro en péptidos más cortos a través de proteasomas, como el proteasoma 20S, cuando el fragmento proteico testado se pone en presencia de dicho proteasoma, particularmente según el método detallado siguiente. El
- 25
- fragmento proteico (aproximadamente 75 µg cuando se trata de un polipéptido de aproximadamente 30 aminoácidos) se incubaba a 37°C con aproximadamente 15µg de proteasoma 20S (Calbiochem Ref 539150, La Jolla, CA, EEUU) en 500 µl del tampón siguiente: 20 mM de Tris-HCl pH8, 0,5 mM EDTA. Alicuotas de 50 µl son tomadas después del tiempo de incubación de 24 y 48 horas, y se analizan por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los productos de digestión de los proteasomas se separan por RP-HPLC (Perkin Elmer) utilizando una columna C18 y un gradiente de acetonitrilo (de 0 a
- 30
- 100 % que contiene 0,1 % de ácido trifluoroacético, en 90 mn, índice de elución 0,8 ml/mn). Los productos de división se detectan a 214 nm por un detector de absorción (759A, Applied Biosystems).
- [0005] Ventajosamente las regiones poliepitópicas definidas arriba poseen la característica de contener aminoácidos hidrófobos.
- 35
- [0006] Los diferentes epítipos de la región poliepitópica de la proteína determinada, y delimitando los fragmentos proteicos poliepitópicos, son ventajosamente seleccionados entre los péptidos;
- ligándose a una molécula determinada del CMH, particularmente a una molécula de tipo HLA determinado, y esto hasta concentraciones de aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-10} M en péptido para unas concentraciones de
 - 40
 - aproximadamente 10^{-7} M en molécula HLA, particularmente en las condiciones descritas más adelante,
 - y formando un complejo estable con esta molécula del CMH, a saber particularmente un complejo en el cual dicho péptido queda ligado a dicha molécula durante al menos aproximadamente 3 horas a 37°C.
- 45
- [0007] A título de ilustración, los epítipos anteriormente mencionados de la invención son seleccionados entre los péptidos susceptibles:
- por una parte de asociarse con las moléculas del CMH, particularmente por puesta en marcha del método siguiente:
 - . incubación (particularmente durante aproximadamente 2 horas a 25°C, luego aproximadamente 15 horas a 4°C) del péptido en presencia de moléculas del CMH, provenientes de la lisis de células humanas o animales, o purificadas particularmente por cromatografía de afinidad a partir de líneas celulares humanas o animales,
 - 50
 - . atrapamiento de los complejos formados en el momento de la etapa precedente en un soporte sólido recubierto de un primer anticuerpo, particularmente monoclonal, reconociendo específicamente las moléculas del CMH en su conformación dependiente de su enlace a dicho péptido,
 - . adición sobre el soporte sólido precedente de un segundo anticuerpo marcado, particularmente por acoplamiento a un
 - 55
 - marcador radioactivo, enzimático o fluorescente, dicho anticuerpo marcado reconociendo específicamente sea las cadenas pesadas del CMH en su conformación dependiente de su enlace al péptido, sea la cadena ligera del CMH o la β2-microglobulina ligándose específicamente a las diferentes cadenas pesadas del CMH en su conformación mencionada,
 - . detección, después de enjuague del soporte sólido, de la eventual presencia del segundo anticuerpo marcado que ha quedado fijado sobre el soporte sólido, demostrando un efecto de asociación entre las moléculas del CMH y el péptido estudiado,
 - 60
 - y, por otra parte, de formar un complejo con dichas moléculas del CMH, cuya estabilidad se puede evaluar por puesta en marcha de un método de seguimiento en el tiempo del enlace establecido entre el péptido y las moléculas del CMH, este

método siendo ventajosamente efectuado según un protocolo idéntico al método precedente, pero en el cual la etapa de incubación del péptido en presencia de las moléculas del CMH sobre el soporte sólido recubierto de dicho primer anticuerpo, es precedido por una etapa previa de eliminación del péptido libre susceptible de estar presente en el medio reactivo, particularmente por enjuague del soporte sólido, dicha etapa de incubación siendo efectuada (ventajosamente a una temperatura de 37°C) durante tiempos variables de 1h, 3h, 5h, 24h y 48h.

[0008] Como se ha mencionado más arriba, los epítomos de la invención deben ser reconocidos por las células T en asociación con las moléculas del CMH y asociarse a estas últimas, particularmente en el marco de la puesta en marcha de la prueba de reconocimiento descrita arriba. Esta asociación puede ser débil (detectable a concentraciones en análogos peptídicos del orden de 10^{-4} a 10^{-5} M), intermedia (detectable a concentraciones en análogos peptídicos del orden de 10^{-6} a 10^{-7} M), o fuerte (detectable a concentraciones en análogos peptídicos del orden de 10^{-8} a 10^{-9} M). Los péptidos asociados a las moléculas del CMH en el marco de la presente invención son de preferencia susceptibles de ligarse durante al menos aproximadamente 3 horas en dichas moléculas del CMH.

[0009] La invención tiene más particularmente como objeto los epítomos (de nuevo designados péptidos más arriba y a continuación) tal como se han descrito arriba y caracterizados por el hecho de que son seleccionados entre aquellos susceptibles:

- de inducir in vitro la citólisis a través de linfocitos T citotóxicos, de células diana que presentan en su superficie el péptido anteriormente mencionado asociado a las moléculas del CMH, dichos linfocitos T citotóxicos estando ventajosamente tomados en un paciente padeciendo una patología en la cual está implicado el péptido estudiado,
- y de inducir in vitro la secreción de citoquinas (o interleuquinas) por los linfocitos T citotóxicos anteriormente mencionados, particularmente IL-2, IL-4 o el interferón y.

[0010] Llegado el caso, los epítomos anteriormente mencionados son elegidos entre aquellos capaces de inducir in vitro la aparición y el crecimiento de linfocitos T citotóxicos a partir de células humanas o animales, particularmente a partir de células mononucleadas provenientes de la sangre periférica (PBMC), en presencia de factores necesarios para el crecimiento y la diferenciación de las células T citotóxicas.

[0011] Los fragmentos proteicos poliepitópicos de la invención están aún más caracterizados por el hecho de que son susceptibles de contener los epítomos CD4 reconocidos por las células T auxiliares en asociación con las moléculas del CMH de clase II, esta propiedad favoreciendo la inducción y el mantenimiento de las células T CD8⁺ reconociendo los epítomos comprendidos en dichos fragmentos.

[0012] La presente invención se ilustra con ayuda de la figura 1 representando la secuencia peptídica de la proteína E6 de la cepa 16 de los papillomavirus humanos (HPV 16), así como los fragmentos poliepitópicos de la invención, y los epítomos dentro de estos fragmentos.

[0013] La invención tiene de una forma más particular como objetivo los fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV, y de una forma más particular aquellos de la proteína E6 representada en la figura 1, o por la SEC ID NO: 2, de HPV 16, caracterizados por el hecho de que comprenden una secuencia peptídica de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos, esta secuencia peptídica conteniendo las secuencias en aminoácidos de al menos 3 epítomos diferentes, y de preferencia de al menos 4 epítomos diferentes que se ligan de manera estable a las moléculas HLA de tipo idéntico o diferente, cuando estos epítomos se obtienen por degradación enzimática de dicha secuencia peptídica, particularmente en el proteasoma, de modo que al menos 4 moléculas de HLA de diferentes tipos, y de preferencia al menos 5 moléculas de HLA de diferentes tipos, se ligan a estos epítomos, estas 4 o 5 moléculas de HLA estando elegidas entre aquellas de tipo A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44, B51, y B62.

[0014] Ventajosamente, los fragmentos poliepitópicos según la invención son tales que el número de aminoácidos de su secuencia peptídica es superior o igual a 17, e inferior o igual a 30.

[0015] La invención se refiere de una forma más particular a los fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV definidos arriba, caracterizados por el hecho de que comprenden una secuencia peptídica de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos, esta secuencia peptídica conteniendo las secuencias en aminoácidos de al menos 6 epítomos diferentes que se ligan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo idéntico o diferente, cuando estos epítomos se obtienen por degradación enzimática de dicha secuencia peptídica, particularmente en el proteasoma, de modo que al menos 6 moléculas de HLA de diferentes tipos, y de preferencia al menos 7 moléculas de HLA de diferentes tipos se ligan a estos epítomos, estas 6 o 7 moléculas de HLA estando elegidas entre aquellas de tipo A1, A2, A3; A11; A24; A29, B7, B8; B18; B27; B35; B44, y B51.

[0016] Ventajosamente, los fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 según la invención, son tales que el número de aminoácidos de su secuencia peptídica es superior o igual a 20 (de preferencia superior o igual a 22), e inferior o igual a 30.

[0017] Ventajosamente de nuevo, los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados de la proteína E6 de HPV, se caracterizan por el hecho de que comprenden todos un epítipo que se liga a la molécula de HLA de tipo B35, un epítipo que se liga a la molécula de HLA de tipo B44, y un epítipo que se liga a la molécula de HLA de tipo B51.

[0018] La invención se refiere igualmente al fragmento poliepitópico de la proteína E6 de HPV como se define más arriba, caracterizado por el hecho que corresponde al fragmento de 17 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 46 y 62, o al fragmento de 22 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 46 y 67 de la secuencia peptídica de la proteína E6 de HPV, este último fragmento estando caracterizado por la secuencia peptídica SEC ID NO: 6 siguiente:

(46)RREYDFAFRDLCIVYRDGNPY(67)

dicho fragmento que contiene 6 epítipos que se ligan de manera estable a al menos una de las 10 moléculas de HLA de los tipos sucesivos: A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, o B51, dichos epítipos siendo los sucesivos:

- (46)RREYDFAFR(55) se ligan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B27,
- (49)YDFAFRDL(57) se ligan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A24,
- (50)YDFAFRDL(57) se ligan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A29, o B44,
- (52)FAFRDLCIV(60) se ligan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A2, B35, B51, o B7,
- (54)FRDLCIVYR(62) se ligan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A3, o A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) se ligan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A3, o A11.

[0019] La invención se refiere a igualmente las secuencias peptídicas derivadas de los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados de la proteína E6 (particularmente;

- por sustitución, y/o supresión, y/o adición de uno o varios aminoácidos, de los fragmentos anteriormente mencionados, y/o
- por modificación de al menos un enlace peptídico -CO-NH- de la cadena peptídica de los fragmentos anteriormente mencionados, particularmente por introducción de un enlace del tipo retro, o retro-inverso, y/o
- por sustitución de al menos un aminoácido de la cadena peptídica de la secuencia o del fragmento anteriormente mencionado, por un aminoácido no proteínogénico,

dichas secuencias derivadas conteniendo los péptidos o pseudopéptidos se ligan específicamente a la o a las mismas moléculas del CMH que aquellas que se ligan a los péptidos contenidos en los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados de los cuales derivan.

[0020] Por secuencia derivada por introducción de un enlace retro-inverso, se debe entender todo análogo peptídico de un fragmento anteriormente mencionado, dicho análogo estando constituido de una cadena peptídica en la cual uno al menos de los residuos por una parte se liga con al menos un residuo vecino por un enlace -NH-CO-, y por otra parte, es de quiralidad opuesta a aquella de este mismo residuo de aminoácido en la cadena peptídica del péptido padre (a saber del fragmento anteriormente mencionado del cual ésta deriva).

[0021] Por secuencia derivada por introducción de un enlace retro, se debe entender todo análogo peptídico de un fragmento anteriormente mencionado, dicho análogo estando constituido de una cadena peptídica en la cual uno al menos de los residuos, se liga con al menos un residuo vecino por un enlace -NH-CO-, la quiralidad de la totalidad de los residuos de aminoácidos implicados en al menos un enlace -NH-CO- estando conservada respecto a los residuos correspondientes de la cadena peptídica del péptido padre.


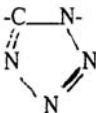
[0022] Es evidente que los enlaces -CO-NH- y -NH-CO- se deben tener en cuenta en lo que precede, en el sentido de la cadena peptídica madre que va desde la extremidad aminoterminal (N-terminal) hacia la extremidad carboxiterminal (C-terminal).

[0023] Por "aminoácido proteínogénico", se entiende, en lo que precede, todo aminoácido incluido en la constitución de una proteína o de un péptido natural.

[0024] Por "aminoácido no proteínogénico", se entiende por oposición a la definición precedente, todo aminoácido no incluido en la constitución de una proteína o de un péptido natural. Se entiende de una forma más particular por "aminoácido no proteínogénico", todo aminoácido cuyo carbono que lleva la cadena lateral R, a saber el grupo -CHR-, situado entre -CO- y -NH- en la cadena peptídica natural, se reemplaza por un motivo no incluido en la constitución de una proteína o de un péptido natural.

[0025] La invención tiene de una forma más particular como objetivo las secuencias derivadas tal como se describe arriba, caracterizadas por el hecho de que uno al menos de los enlaces peptídicos -CO-NH- de la cadena peptídica del péptido padre se reemplaza por un enlace diferente del enlace -CO-NH-, dicho enlace diferente estando particularmente elegido

entre los siguientes:

	-CH ₂ -NH-	(metileno amino);
	-CH ₂ -CH ₂ -	(carba);
5	-CO-CH ₂ -	(cetometileno);
	-CH ₂ O	(metileno-oxi);
	-CHOH-CH ₂ -	(hidroxietileno);
	-CHOH-CHOH-	(di-hidroxietileno);
10	-CH=CH-	(E o Z olefina);
	-CHCN-NH-	(cianometileno amino);
	-S-CH ₂ -	(tiometileno);
	-CH ₂ -S-	(metileno tio);
	-CS-NH-	(tioamida);
15	-PO ₂ -NH-	(fosfonamida);
	-CHOH-	(hidroximetileno);
	-NH-CO-NH-	(úrea);
		(oxirano);
		(tetrazol);
	-CH ₂ -CO-NH-	(β-homologación);
20	-CHOH-CH ₂ -NH-	(hidroxietileno amino);
	-CO-NH-NH-	(hidrazino).

[0026] La invención tiene igualmente como objetivo las secuencias nucleótidas codificando para un fragmento polipeptídico de la proteína E6, o para una secuencia peptídica derivada, tal como se define arriba, dichas secuencias nucleótidas provenientes de la secuencia SEC ID NO: 1 codificando para la proteína E6.

[0027] Por ello, la invención tiene de una forma más particular como objetivo la secuencia nucleótida definida más abajo, - la secuencia SEC ID NO: 5, codificando para el fragmento polipeptídico SEC ID NO: 6 anteriormente mencionado de la proteína E6,

[0028] La invención tiene igualmente como objetivo todo vector, particularmente plásmido, cósmido o fago, que contiene al menos una secuencia nucleótida mencionada colocada bajo el control de los elementos necesarios para la transcripción de dicha secuencia, particularmente bajo el control de un promotor y de un terminador de transcripción.

[0029] La invención se refiere igualmente a las células huéspedes, particularmente bacterias, virus, levaduras, células eucariotas, transformadas con ayuda de un vector anteriormente mencionado según la invención, de manera que integre de manera estable en su genoma o que mantenga de manera estable en su citoplasma, al menos una secuencia nucleótida según la invención.

[0030] La invención se refiere igualmente a todo vector que incluye uno o varios fragmentos polipeptídicos y/o una o varias secuencias peptídicas derivadas tal como se define arriba, o todo vector que incluye una o varias secuencias nucleótidas anteriormente mencionadas, dichos vectores estando elegidos entre aquellos capaces de asegurar una protección de dichos fragmentos o secuencias nucleótidas en el organismo y/o su penetración en las células del organismo.

[0031] En el caso de la utilización de fragmentos polipeptídicos y/o de secuencias peptídicas derivadas anteriormente mencionadas, tales vectores son elegidos entre los ácidos grasos (en el marco de la preparación de lipopéptidos), los liposomas etc.

[0032] Por ello, la invención tiene de una forma más particular como objetivo todo lipopéptido caracterizado por el hecho de que comprende:

- una parte peptídica que incluye uno o varios fragmentos proteicos polipeptídicos elegidos entre aquellos definidos arriba, o toda secuencia peptídica derivada de dichos fragmentos tal y como está definido arriba,
- y una o varias partes lipófilas, ventajosamente elegidas entre aquellas que incluyen:
 - * una cadena hidrocarbonada en C4 a C20, saturada o insaturada, lineal o ramificada,
 - * o un grupo esteroide, en su caso ligado a la cadena hidrocarbonada mencionada,

dichas partes lipófilas estando eventualmente asociadas a un corto péptido vector (para formar de este modo motivos lipopeptídicos vectores) incluyendo una o varias funciones ionizadas con pH fisiológico, y una función que permite la fijación covalente de dicha cadena hidrocarbonada y/o de dicho grupo esteroide.

- 5 [0033] Por parte lipófila, en lo que precede y en lo que sigue, se entiende toda molécula lipófila, insoluble en agua, que permite, cuando ésta se liga a la parte peptídica definida arriba, un paso intracelular pasivo del lipopéptido obtenido, gracias a las propiedades hidrófobas de dicha molécula. Ventajosamente el lipopéptido resultante del enlace de la parte lipófila a la parte peptídica, es soluble en agua.
- 10 [0034] De preferencia, la cadena hidrocarbonada de las partes lipófilas, se elige entre aquellas de:
 - el ácido palmítico,
 - el ácido oleico,
 - el ácido linoléico,
 - el ácido linolénico.
- 15 [0035] De preferencia igualmente, el grupo esteroide de la o de las partes lipófilas, es elegido entre los derivados del colesterol como el ácido colest-5-enil-3-oxi acético, o el ácido colest-5-enil-3-oxicarbónico.
- 20 [0036] La invención tiene de una forma más particular como objetivo todo lipopéptido como se describe arriba, caracterizado por el hecho de que la o las partes lipófilas se ligan de manera covalente a uno o varios aminoácidos de la parte peptídica.
- [0037] Ventajosamente, la o las partes lipófilas se ligan de manera covalente a la función αNH_2 o ϵNH_2 de una lisina situada en posición N-terminal o C-terminal de la parte peptídica, o a la función tiol de una cisteína, o a toda función amino, alcohol o tiol eventualmente añadida al péptido con un espaciador sencillo.
- 25 [0038] Por ello, la invención tiene de una forma más particular como objetivo todo lipopéptido como se define arriba, en el cual la o las partes lipófilas se representan por un grupo N^α-acetil-Lisina N^ε(palmitoil) (de nuevo designado por la abreviatura Ac-K(Pam)).
- 30 [0039] La presente invención tiene igualmente como objetivo, micelas o microagregados de uno o varios lipopéptidos diferentes definidos arriba.
- [0040] Ventajosamente, dichas micelas o microagregados tienen un tamaño inferior a aproximadamente 1 μm .
- 35 [0041] De preferencia, las micelas o microagregados según la invención, son tales que obtenidos por dispersión de dichos lipopéptidos en una solución de ácido acético concentrada a aproximadamente 80%, o cualquier otro solvente capaz de asegurar una dispersión molecular de los lipopéptidos en solución.
- 40 [0042] En el caso de la utilización de secuencias nucleótidas definidas arriba según la invención, los vectores anteriormente mencionados son elegidos entre los virus, particularmente los retrovirus, los adenovirus y los virus asociados (AAV Adeno Associated Virus).
- [0043] La invención tiene igualmente como objetivo los anticuerpos dirigidos contra los fragmentos proteicos poliepitópicos o los epítomos o sus secuencias peptídicas derivadas (o análogos) tal como se define arriba, dichos anticuerpos siendo tales como se obtiene por inmunización de un animal con al menos uno de los complejos anteriormente mencionados, dichos anticuerpos siendo susceptibles de formar un complejo con estos fragmentos poliepitópicos o estos epítomos o sus análogos.
- 45 [0044] Los anticuerpos según la invención son los anticuerpos policlonales o monoclonales.
- 50 [0045] Los anticuerpos policlonales anteriormente mencionados se obtienen por inmunización de un animal con al menos un fragmento proteico poliepitópico o un epítomo o un análogo según la invención, seguido de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los otros componentes del suero, particularmente por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, particularmente un fragmento proteico poliepitópico o un epítomo o un análogo según la invención.
- 55 [0046] Los anticuerpos monoclonales según la invención pueden ser obtenidos por la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.
- 60 [0047] En primer lugar, se inmuniza un animal, habitualmente un ratón, (o células en cultivo en el marco de inmunizaciones

5 in vitro) con un fragmento proteico poliepitópico o un epítipo o un análogo según la invención, contra los cuales los linfocitos B del animal son entonces capaces de producir los anticuerpos. Estos linfocitos productores de anticuerpos son a continuación fusionados con células mielomatosas "inmortales" (particularmente murinas) para dar lugar a los hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células obtenida de este modo, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir unos anticuerpos particulares y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma es multiplicado bajo la forma de clones, cada uno conduciendo a la producción de unos anticuerpos monoclonales cuyas propiedades de reconocimiento frente al fragmento proteico poliepitópico o epítipo o análogo de la invención podrán ser testadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con ayuda de un biocaptador. Los anticuerpos monoclonales seleccionados de este modo, son después purificados particularmente según la técnica de cromatografía de afinidad descrita arriba.

10 [0048] La invención se refiere igualmente a la utilización de uno o varios anticuerpos anteriormente mencionados para la puesta en marcha de un método de diagnóstico in vitro de las patologías anteriormente mencionadas.

15 [0049] Por ello la invención tiene igualmente como objetivo estuches o kits que incluyen dichos anticuerpos, para la puesta en marcha de un método de diagnóstico tal y como se define arriba.

[0050] La invención se refiere igualmente a las composiciones farmacéuticas, o vacunas, caracterizadas por el hecho de que comprenden:

20 * a)
 - al menos un fragmento poliepitópico de la proteína E6 como se define arriba,
 - y/o al menos una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como se define arriba,
 - y/o al menos un vector apropiado, particularmente de los lipopéptidos y/o micelas definidas arriba, que contiene al menos un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6, y/o al menos una secuencia derivada mencionada de estos fragmentos,
 25 en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable,
 dicho fragmento proteico poliepitópico y/o su secuencia derivada estando en su caso asociados a uno o varios otros epítipos exógenos reconocidos por células T auxiliares (de nuevo designadas epítipos CD4 o T helper), dichos epítipos estando elegidos particularmente entre los siguientes:
 30 . el fragmento peptídico delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 830 y 846 de la secuencia peptídica de la toxina tetánica, dicho fragmento respondiendo a la fórmula siguiente: QYIKANSKFIGITELKK,
 . la hemaglutinina (Prevost-Blondel et al., 1995, J. Virol., 62; n°12, págs. 8046-8055),
 . el epítipo PADRE (Alexander et al., 1994, Immunity, 1, 751).

35 * o b)
 - al menos una secuencia nucleótida tal y como se define arriba, codificando para un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6,
 - y/o al menos una secuencia nucleótida codificando para una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como se define arriba,
 40 las secuencias nucleótidas anteriormente mencionadas que pueden ser utilizadas desnudas, como minigenes,
 - y/o al menos un vector apropiado anteriormente mencionado, elegido particularmente entre los virus tal como se define más arriba, conteniendo al menos una secuencia nucleótida mencionada,
 en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable,

45 * o c)
 - anticuerpos definidos arriba, dirigidos contra un fragmento poliepitópico de la proteína E6, y/o contra una secuencia peptídica derivada de estos fragmentos, tal como se define arriba, en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

50 [0051] Ventajosamente las composiciones farmacéuticas, o vacunas, anteriormente mencionadas, se presentan bajo una forma administrable por vía subcutánea, particularmente a razón de varias inyecciones (ventajosamente 3 inyecciones) de aproximadamente 500 µg del fragmento poliepitópico en forma lipopeptídica, con aproximadamente un mes de intervalo.

55 [0052] La invención tiene de una forma más particular como objetivo la utilización de fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 definidos arriba, o de secuencias peptídicas derivadas anteriormente mencionadas, o de secuencias nucleótidas definidas más arriba, o de anticuerpos anteriormente mencionados, o de lipopéptidos definidos arriba, para la preparación de un medicamento o vacuna destinado a la prevención o al tratamiento de patologías ligadas a la infección de individuos por los papillomavirus humanos, tales como las neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN), el cáncer invasivo del cuello del útero, las neoplasias vulvares intraepiteliales (VIN).

60 [0053] La invención se refiere a igualmente los péptidos o epítipos de la proteína E6 de HPV elegidos entre los siguientes:
 - (46)RREVDFAFR(55) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,

- (49)VYDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24,
- (50)YDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, B44,
- (52)FAFRDLCIV(60) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A2, B35, B51,
- (54)FRDLCIVYR(62) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, A11,

[0054] La invención se refiere igualmente a las secuencias peptídicas derivadas de los péptidos anteriormente mencionados, dichas secuencias derivadas, o análogos, siendo tal como se define arriba en el marco de las secuencias derivadas de los fragmentos proteicos poliepitópicos anteriormente mencionados.

[0055] La invención tiene igualmente como objetivo las secuencias nucleótidas que codifican para los péptidos de la proteína E6 anteriormente mencionada, a saber:

- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 136 y 165 de la secuencia SEQ ID NO: 1, codificando para (46)RREVDFAFR(55),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 145 y 171 de la secuencia SEC ID NO: 1, codificando para (49)VYDFAFRDL(57), que codifica para (49)VYDFAFRDL(57)
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 148 y 171 de la secuencia SEC ID NO: 1, codificando para (50)YDFAFRDL(57),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 154 y 180 de la secuencia SEQ ID NO: 1, codificando para (52)FAFRDLCIV(60),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 160 y 186 de la secuencia SEC ID NO: 1, codificando para (54)FRDLCIVYR(62),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 175 y 201 de la secuencia SEC ID NO: 1, codificando para (59)IVYRDGNPY(67),

[0056] La invención tiene igualmente como objetivo todo procedimiento de preparación de fragmentos poliepitópicos, de epítomos sencillos (péptidos anteriormente mencionados), o de secuencias derivadas, por síntesis peptídica tradicional en fase líquida o en fase sólida.

[0057] En una variante, los fragmentos poliepitópicos, epítomos sencillos, o secuencias peptídicas derivadas, tal como se define arriba según la invención, pueden ser obtenidos en forma de polipéptidos recombinantes por transformación de células huéspedes apropiadas tal como se define arriba con ayuda de vectores que contienen una secuencia nucleótida recombinante tal y como se define arriba según la invención, y recuperación, en su caso después de la purificación, del polipéptido recombinante codificado por dicha secuencia nucleótida y producido por las células huéspedes anteriormente mencionadas.

LISTA DE SECUENCIAS

[0058]

<110> BIOVECTOR THERAPEUTICS INSERT

<120> FRAGMENTOS PROTEICOS POLIEPITÓPICOS DE LA PROTEÍNA E6 O E7 DE HPV, SU OBTENCIÓN Y SUS UTILIZACIONES PARTICULARMENTE EN VACUNACIÓN

<130> WOB EPIT 2

<140>

<141>

<150> FR 9907012

<151> 1999-06-03

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 477

<212> ADN

ES 2 386 803 T3

<213> Papillomavirus humano

<220>

<221> CDS

5 <222> (1).. (477)

<400> 1

```

atg cac caa aag aga act gca atg ttt cag gac cca cag gag cga ccc 48
Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
  1                    5                10                15

aga aag tta cca cag tta tgc aca gag ctg caa aca act ata cat gat 96
Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
                20                25                30

ata ata tta gaa tgt gtg tac tgc aag caa cag tta ctg cga cgt gag 144
Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
                35                40                45

gta tat gac ttt gct ttt cgg gat tta tgc ata gta tat aga gat ggg 192
Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
                50                55                60

aat cca tat gct gta tgt gat aaa tgt tta aag ttt tat tct aaa att 240
Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
  65                    70                75                80

agt gag tat aga cat tat tgt tat agt ttg tat gga aca aca tta gaa 288
Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
                85                90                95

cag caa tac aac aaa ccg ttg tgt gat ttg tta att agg tgt att aac 336
Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
                100                105                110

tgt caa aag cca ctg tgt cct gaa gaa aag caa aga cat ctg gac aaa 384
Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
                115                120                125

aag caa aga ttc cat aat ata agg ggt cgg tgg acc ggt cga tgt atg 432
Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
                130                135                140

tct tgt tgc aga tca tca aga aca cgt aga gaa acc cag ctg tga 477
Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145                    150                155

```

ES 2 386 803 T3

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

- <210> 2
- <211> 158
- 5 <212> PRT
- <213> Papillomavirus humano
- <400> 2
- 10 <210> 3
- <211> 90
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente
- <220>
- 20 <221> CDS
- <222> (1) .. (90)
- <400> 3

ES 2 386 803 T3

cga ccc aga aag tta cca cag tta tgc aca gag ctg caa aca act ata 48
 Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile
 1 5 10 15

cat gat ata ata tta gaa tgt gtg tac tgc aag caa cag tta 90
 His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu
 20 25 30

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

10 <400> 4

Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile
 1 5 10 15

His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu
 20 25 30

<210> 5

<211> 66

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

20

<220>

<221> CDS

<2.22> (1) .. (66)

25 <400> 5

cga cgt gag gta tat gac ttt gct ttt cgg gat tta tgc ata gta tat 48
 Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr
 1 5 10 15

aga gat ggg aat cca tat 66
 Arg Asp Gly Asn Pro Tyr
 20

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

35 <400> 6

Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Asn Pro Tyr
 20

<210> 7

<211> 87

ES 2 386 803 T3

<212> AD:
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(87)

<400> 7
 att agt gag tat aga cat tat tgt tat agt ttg tat gga aca aca tta 48
 Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu
 1 5 10 15
 gaa cag caa tac aac aaa ccg ttg tgt gat ttg tta att 87
 Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile
 20 25

<210> 8
 15 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente
 20

<400> 8
 Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu
 1 5 10 15
 Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile
 20 25

<210> 9
 25 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

<220>
 <221> CDS
 35 <222> (1)..(66)

<400> 9
 tgt cct gaa gaa aag caa aga cat ctg gac aaa aag caa aga ttc cat 48
 Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His
 1 5 10 15
 aat ata agg ggt cgg tgg 66
 Asn Ile Arg Gly Arg Trp
 20

<210> 10
 40 <211> 22
 <212> PRT

ES 2 386 803 T3

<213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

5

<400> 10

Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His
 1 5 10 15

Asn Ile Arg Gly Arg Trp
 20

<210> 11

<211> 297

10

<212> ADN

<213> Papillomavirus humano

<220>

<221> CDS

15

<222> (1)..(297)

<400> 11

atg cat gga gat aca cct aca ttg cat gaa tat atg tta gat ttg caa 48
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15

cca gag aca act gat ctc tac tgt tat gag caa tta aat gac agc tca 96
 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30

gag gag gag gat gaa ata gat ggt cca gct gga caa gca gaa ccg gac 144
 Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45

aga gcc cat tac aat att gta acc ttt tgt tgc aag tgt gac tct acg 192
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60

ctt cgg ttg tgc gta caa agc aca cac gta gac att cgt act ttg gaa 240
 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80

gac ctg tta atg ggc aca cta gga att gtg tgc ccc atc tgt tct cag 288
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95

aaa cca taa 297
 Lys Pro

<210> 12

<211> 98

20

<212> PRT

<213> Papillomavirus humano

<400> 12

ES 2 386 803 T3

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30
 Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95

Lys Pro

<210> 13

<211> 69

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(69)

15

<400> 13

gga gat aca cct aca ttg cat gaa tat atg tta gat ttg caa cca gag 48
 Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
 1 5 10 15

aca act gat ctc tac tgt tat 69
 Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr
 20

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

25

<400> 14

Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
 1 5 10 15

Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr
 20

<210> 15

<211> 51

ES 2 386 803 T3

- <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente
- <220>
10 <221> CDS
<222> (1) .. (51)
- <400> 15
- ```

caa gca gaa ccg gac aga gcc cat tac aat att gta acc ttt tgt tgc 48
Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
 1 5 10 15

aag 51
Lys

```
- <210> 16  
15 <211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente
- 20 <400> 16
- ```

Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
  1             5             10             15

Lys

```
- <210> 17
25 <211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
30 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente
- <220>
35 <221> CDS
<222> (1) .. (57)
- <400> 17
- ```

ttg gaa gac ctg tta atg ggc aca cta gga att gtg tgc ccc atc tgt 48
Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
 1 5 10 15

tct cag aaa 57
Ser Gln Lys

```
- <210> 18  
40 <211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente
- 45



ES 2 386 803 T3

<400> 18

Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys  
1 5 10 15

Ser Gln Lys

5

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de fragmentos poliepitópicos que contienen 6 epítomos de la proteína E6 de HPV, elegidos entre aquellos que incluyen:
- 5 - el fragmento que contiene 6 epítomos delimitados por los aminoácidos situados en las posiciones 46 y 62, o en las posiciones 46 y 67 de la secuencia peptídica de la proteína E6, este último fragmento estando caracterizado por la secuencia peptídica siguiente:  
(46)RREYDF AFRDLCIVYRDGNPY(67)  
dicho fragmento conteniendo los péptidos, cada péptido ligándose de manera estable a una al menos de las moléculas HLA de tipo A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, o B51, dichos epítomos siendo los siguientes:
- 10 - (46)RREYDFAFR(55) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,  
- (49)VYDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24,  
- (50)YDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, o B44,  
- (52)FAFRDLCIV(60) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A2, B35, B51, o B7;
- 15 - (54)FRDLCIVYR(62) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, o A11,  
- (59)IVYRDGNPY(67) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, o A11  
y las secuencias peptídicas derivadas de los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados,  
- por sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos, de los fragmentos anteriormente mencionados, y/o  
- por modificación de al menos un enlace peptídico -CO-NH- de la cadena peptídica de los fragmentos anteriormente mencionados, particularmente por introducción de un enlace del tipo retro, o retro-inverso, y/o
- 20 - por sustitución de al menos un aminoácido de la cadena peptídica de la secuencia o del fragmento anteriormente mencionado, por un aminoácido no proteínogénico, dichas secuencias derivadas conteniendo los péptidos o pseudopéptidos, cada péptido ligándose específicamente a la o a las mismas moléculas del CMH que aquellas ligándose a los péptidos contenidos en los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados de los cuales éstas derivan, para la preparación de un medicamento o vacuna destinado a la prevención o al tratamiento de patologías ligadas a la infección de individuos por los papillomavirus humanos; tales como las neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN), el cáncer invasivo del cuello del útero, las neoplasias vulvares intraepiteliales (VIN).
- 25
2. Utilización de fragmentos poliepitópicos según la reivindicación 1 caracterizada por el hecho de que el número de aminoácidos de la secuencia peptídica de dichos fragmentos es superior o igual a 17 e inferior o igual a 30.
- 30
3. Utilización de fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por el hecho de que dicho fragmento contiene 6 epítomos, cada epítomo ligándose de manera estable a una al menos de las 10 moléculas HLA de los tipos sucesivos: A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, o B51, dichos epítomos siendo los sucesivos:
- 35 - (46)RREYDFAFR(55) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,  
- (49)VYDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24,  
- (50)YDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, o B44,  
- (52)FAFRDLCIV(60) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A2, B35, B51, o B7;
- 40 - (54)FRDLCIVYR(62) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, o A11,  
- (59)IVYRDGNPY(67) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, o A11.
4. Fragmentos poliepitópicos que contienen 6 epítomos de la proteína E6 de HPV, elegidos entre aquellos que incluyen:
- 45 - el fragmento que contiene 6 epítomos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 46 y 62, o en las posiciones 46 y 67 de la secuencia peptídica de la proteína E6, este último fragmento estando caracterizado por la secuencia peptídica siguiente:  
(46)RREYDFAFRDLAIVYRDGNPY(67)  
dicho fragmento conteniendo los péptidos, cada péptido ligándose de manera estable a una al menos de las moléculas HLA de tipo A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, o B51, y
- 50 - las secuencias peptídicas derivadas de los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados,  
- por sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos, de los fragmentos anteriormente mencionados, y/o  
- por modificación de al menos un enlace peptídico -CO-NH- de la cadena peptídica de los fragmentos anteriormente mencionados, particularmente por introducción de un enlace del tipo retro, o retro-inverso, y/o
- 55 - por sustitución de al menos un aminoácido de la cadena peptídica de la secuencia o del fragmento anteriormente mencionado, por un aminoácido no proteínogénico, dichas secuencias derivadas conteniendo los péptidos o pseudopéptidos ligándose específicamente a la o a las mismas moléculas del CMH que aquellas ligándose a los péptidos contenidos en los fragmentos poliepitópicos mencionados arriba de los cuales éstas derivan.
5. Fragmentos poliepitópicos según la reivindicación 4 caracterizados por el hecho de que el número de aminoácidos de la secuencia peptídica de dichos fragmentos es superior o igual a 17 e inferior o igual a 30.
- 60

6. Fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, dicho fragmento conteniendo 6 epítomos, cada epítomo ligándose de manera estable a una al menos de las 10 moléculas HLA de los tipos siguientes: A2, A3, A11; A24, A29, B7, B27, B35, B44, o B51, dichos epítomos siendo los siguientes:
- (46)RREVVYDFAFR(55) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,
  - (49)VYDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24,
  - (50)YDF AFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, o B44,
  - (52)FAFRDLCIV(60) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A2, B35, B51, o B7,
  - (54)FRDLCIVYR(62) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, o A11,
  - (59)IVYRDGNPY(67) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, o A11.
7. Secuencias nucleótidas que codifican para un fragmento poliepitópico o para una secuencia peptídica derivada según la reivindicación 4.
8. Anticuerpos, policlonales o monoclonales, dirigidos contra un fragmento poliepitópico o contra una secuencia peptídica derivada según la reivindicación 4.
9. Composición farmacéutica, o vacuna, caracterizada por el hecho de que comprende:
- a)
    - al menos un fragmento poliepitópico de la proteína E6 definido en la reivindicación 4,
    - y/o al menos una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como se define en la reivindicación 4,
    - y/o al menos un vector apropiado, particularmente de los lipopéptidos y/o micelas, que contiene al menos un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6, y/o al menos una secuencia derivada mencionada de estos fragmentos, en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable, dicho fragmento proteico poliepitópico y/o su secuencia derivada estando en su caso asociados a uno o varios otros epítomos exógenos reconocidos a través de células T auxiliares, tales como el fragmento peptídico delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 830 y 846 de la secuencia peptídica de la toxina tetánica, la hemaglutinina, o el epítomo PADRE,
  - o b)
    - al menos una secuencia nucleótida según la reivindicación 7, codificando para un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6,
    - y/o al menos una secuencia nucleótida codificando para una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como está definido arriba,
    - y/o al menos un vector apropiado anteriormente mencionado, elegido particularmente entre el virus, que contiene al menos una secuencia nucleótida mencionada,
  - en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable,
  - o c)
    - anticuerpos según la reivindicación 8, dirigidos contra un fragmento poliepitópico de la proteína E6, y/o contra una secuencia peptídica derivada de estos fragmentos, tal como se define arriba.
10. Epítomos de la proteína E6 de HPV elegidos entre los siguientes:
- (46)RREVVYDFAFR(55) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,
  - (50)YDFAFRDL(57) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, B44,
  - (54)FRDLCIVYR(62) ligándose de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, A11.

