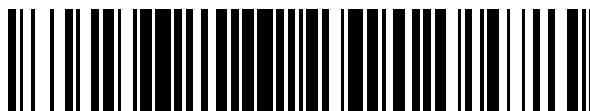


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 451**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03774615 .3**

96 Fecha de presentación: **02.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1553966**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

54 Título: **Péptidos de fusión que comprenden los polipéptidos E7 y E6 de virus del papiloma humano y composiciones inmunogénicas de los mismos**

30 Prioridad:
03.10.2002 US 415929 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2012

73 Titular/es:
**WYETH HOLDINGS CORPORATION (100.0%)
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
**SMITH, LARRY;
CASSETTI, MARIA, CRISTINA;
PULLEN, JEFFREY K. y
MCELHINEY, SUSAN P.**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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 2 391 451 T3

DESCRIPCIÓN

Péptidos de fusión que comprenden los polipéptidos E7 y E6 de virus del papiloma humano y composiciones inmunogénicas de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas e inmunogénicas usadas para tratar o prevenir cáncer cervical y otros cánceres causados por virus del papiloma humano (VPH). En particular, la presente invención se refiere a proteínas de fusión y los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de fusión, usadas para generar respuestas inmunes frente a VPH. Estas proteínas y polinucleótidos de fusión se usan en el tratamiento y prevención de cánceres inducidos por VPH.

10 **Antecedentes de la invención**

- El cáncer de cuello uterino es la segunda causa principal de muertes relacionadas con tumores en mujeres, representando 250.000 muertes por año en todo el mundo. Se sabe que más del 99 % de todos los cánceres cervicales están asociados con infección por virus del papiloma humano (VPH), de los que el 50 % están ligados directamente con VPH de tipo 16 (VPH16) (Walboomers y col., J. Path. 1999, 189: 12-19). Aunque la mayoría de las infecciones por VPH16 son sintomáticas y transitorias, un cierto porcentaje de ellas se hace persistente. Aproximadamente el 1 % de individuos infectados de forma persistente progresan a lesiones cervicales crecientemente graves conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (CIN), y con el tiempo a carcinoma cervical invasivo.

- Las proteínas de VPH tempranas conocidas como E6 y E7 son necesarias para mantener el fenotipo maligno (Von Knebel y col., Int J Cancer 1992, 51: 831-4; Crook y col., Embo J 1989, 8: 513-9; He y Huang, Cancer Res. 1997, 57: 3993-9). Estas proteínas se expresan uniformemente en lesiones de CIN y cánceres (Smotkin y Wettstein, Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:4680-4; Durst y col., Virology 1992, 189: 132-40). Estas proteínas inducen proliferación del epitelio interrumpiendo la regulación del ciclo celular. Específicamente E7 se une a e inactiva la proteína del retinoblastoma (Rb) supresora de tumores celulares (Dyson y col., Science 1989, 243: 934-7), lo que da como resultado progresión de la célula a la fase S del ciclo celular (Cobrinik y col., Trends Biochem Sci 1992, 17: 312-5). La proteína E6 de VPH16 induce degradación de la proteína supresora de tumores p53 (Scheffner y col., Cell 1990, 63: 1129-36), evitando que la célula experimente apoptosis.

- Debido a que las células tumorales expresan de forma constitutiva las proteínas E6 y E7, y estas proteínas no están presentes en células normales, estas proteínas virales son dianas muy atractivas para inmunoterapia de cáncer. Muchas líneas de pruebas sugieren que una respuesta inmune mediada por células contra E6 y E7 en seres humanos se correlaciona con la regresión natural de lesiones de VPH y eliminación de ADN viral (Nakagawa y col., J Infect Dis 1997, 175: 927-31; Kadish y col., J Natl Cancer Inst 1997, 89: 1285-93). Además se ha mostrado que una respuesta de CTL contra E7 protege a los ratones contra tumores positivos contra tumores positivos para VPH16 en diferentes modelos murinos (Feltkamp y col., Eur J Immunol 1995, 25: 2638-42; Lin y col., Cancer Res 1996, 56: 21-6).

- Puesto que la inmunidad mediada por células (CMI) parece ser importante en el combate de infección por VPH y enfermedad (Eiben, G.L. y col., Adv Can Res 2002, 86: 113-148), una vacuna terapéutica debería generar respuesta de linfocitos T óptimas frente a numerosos péptidos antigénicos E6 y E7 de VPH para una cobertura eficaz en poblaciones diversas de antígenos de leucocitos humanos (HLA).

- Un vector de vacuna prometedor para suministrar antígenos E6/E7 es un vector de alfavirus recombinante (AV) derivado de la cepa 3014 atenuada de virus de la encefalitis equina venezolana (VEE; Velders M.P. y col., Cancer Res 2001, 61: 7861-7867). Se ha demostrado que partículas de replicón de VEE (VRP) incompetentes para replicación son vacunas altamente eficaces en varios modelos de tumor y enfermedad infecciosa preclínicos (Rayner, J.O. et al., Rev Med Virol 2002, 12: 279-296). Los vectores de replicón derivado de AV tales como VEE codifica genes heterólogos en forma de ARN, no se expanden más allá de infección inicial e inducen apoptosis de células infectadas (Griffith, D.E. y col., Annu. Rev. Microbiol. 1997, 51: 565-592). Estos atributos limitan las oportunidades de expresión prolongada de proteínas o integración en el ADN huésped que son características de tumores malignos inducidos por VPH después de infección natural. La baja prevalencia de inmunidad anti-VEE preexistente y las posibilidades de inmunización repetida con VRP (Pushko, P. y col., Virology 1997, 239: 389-401) son ventajas frente a otros vectores virales recombinantes tales como virus vaccinia o adenovirus.

- Boursnell M. y col. (Vaccine, 1996, vol. 14, número 16, páginas 1485-1494) desvelan virus vaccinia recombinantes que codifican proteínas de fusión E6-E7 de VPH16 y VPH18 con mutaciones de aminoácidos en los restos 24 y 26 de E7.

- Borysiewicz LK y col. (Lancet, 1996, vol. 347, número 9014, páginas 1523-1527), desvelan para su uso como inmunoterapia para cáncer cervical virus vaccinia recombinante que codifica proteínas de fusión E6-E7 de VPH16 y VPH18 con mutaciones de aminoácidos en los restos 24 y 26 de E7.

El documento WO99/10375 desvela una vacuna que comprende una proteína de fusión E6-E7 de VPH con mutaciones de aminoácidos en los restos 24 y 26 de E7 unida con un compañero de fusión.

El documento US 6.004.557 desvela una vacuna que comprende una proteína de fusión E6-E7 de VPH16 en la que una o ambas de E7 y E6 puede tener una mutación de delección.

- 5 Dalal S y col. (Journal of Virology, 1996, vol. 70, número 2, páginas 683-688) desvela VPH16 con mutaciones de aminoácidos en diversos restos, incluyendo los restos 63 y 106 de E6.

Edmonds C y col. (Journal of virology, 1989, vol. 63, número 6, 1989, páginas 2650-2656) desvelan VPH16 con mutaciones de aminoácidos en diversos restos, incluyendo los restos 24, 26 y 91 de E7.

- 10 Velders MP y col. (Cancer Research, 2001, vol. 61, número 21, páginas 7861-867) desvelan vacunación con vector de encefalitis equina venezolana recombinante que codifica la proteína E7 de VPH16 (sin mutaciones).

Kast W y col. (Journal of Immunology, 1994, vol. 152, número 8, 1994, páginas 3904-3912) desvela la afinidad de unión de cinco alelos de HLA-A de un conjunto de todos los péptidos monoméricos posibles de proteínas E6 y E7 de VPH 16 para seleccionar candidatos a vacuna.

- 15 Murakami M y col. (Cancer Research, 1999, vol. 59, número 6, páginas 1184-187), desvela la inducción de respuestas de CTL a proteínas E6 y E7 de VPH usando una proteína de fusión E6-E7 recombinante (sin mutaciones) y células dendríticas humanas autólogas.

Offringa y col. (Current Opinion in Immunology, 2000, vol. 12, número 5, páginas 576-582), desvela vacunas que comprenden proteínas E6 y E7 de VPH que pueden mutarse para carecer de capacidad de transformación, como parte de un artículo de revisión sobre estrategias de vacuna contra el cáncer.

- 20 Aunque son dianas atractivas para inmunoterapia de cáncer, E6 y E7 tienen actividad transformante. En consecuencia, los procedimientos de inmunoterapia que usan E6 y E7 que se contemplan en la actualidad en la técnica son potencialmente arriesgados debido a que estas proteínas pueden inducir transformación e inmortalización de las células.

- 25 Sigue habiendo una necesidad no satisfecha de composiciones eficaces para el tratamiento y prevención de CIN y carcinoma cervical. Más específicamente, existe la necesidad de composiciones inmunogénicas incluyendo composición basada en E6 y/o E7, que son tanto seguras como eficaces para tratar y/o prevenir CIN, carcinoma cervical, carcinoma anal y otros trastornos tales.

- 30 Los estudios anteriores de composiciones inmunogénicas de VPH se han limitado por la falta de modelos tumorales que expresaran HLA de clase 1 en ratones. Se describe en el presente documento un modelo positivo de E6/E7 de VPH16; este modelo forma tumores de crecimiento progresivo en ratones transgénicos HLA-A*0201.

Sumario de la invención

La presente invención satisface las necesidades anteriormente descritas y otras proporcionando composiciones farmacéuticas y polipéptidos que comprenden fusiones de polipéptidos E6 y E7 que portan mutaciones y un orden de fusión (E7E6) que reduce la actividad biológica y por lo tanto el potencial de actividad transformadora de E6 y E7.

- 35 En particular, la presente invención proporciona nuevos polipéptidos de fusión de E7E6 y los polinucleótidos que los codifican. En realizaciones específicas, la invención proporciona polipéptidos que comprenden los polipéptidos E6 y E7 del virus del papiloma humano en los que el polipéptido E7 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 24, 26 y 91 de la SEC ID N° 14 y el polipéptido E6 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 63 y 106 de la SEC ID N° 13. En una realización específica, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido E7 en el que ambos de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 24 y 26 de la SEC ID N° 14 están mutados. Estos polipéptidos mutados pueden tener un resto de glicina en cualquiera de estas posiciones mutadas y E6 está carboxilo terminal de E7.

- 40 La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican estos polipéptidos. Por ejemplo, en una realización de la invención el ácido nucleico aislado comprende secuencias de E6 y E7 de virus del papiloma humano en las que la secuencia de nucleótidos E6 tiene mutaciones en cualquier nucleótido o nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 187-189 y 316-318 del gen E6 de VPH 16, y la secuencia de nucleótidos de E7 tiene mutaciones en cualquier nucleótido o nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 70-72, 76-78 y 271-273 del gen E7 de VPH 16, y en las que la mutación o mutaciones dan como resultado que se codifique un aminoácido diferente. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas e inmunogénicas que comprenden estos polipéptidos y polinucleótidos.

La presente invención también proporciona polipéptidos aislados que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N° 9 o SEC ID N° 11. En otras realizaciones, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican tales polipéptidos, incluyendo ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12.

También se proporcionan vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácido nucleico que codifican fusiones E7E6. Por ejemplo, en una realización específica, la invención proporciona vectores de expresión que comprenden SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12 asociados operativamente con (por ejemplo, bajo el control de) una secuencia de control de la expresión.

- 5 También se proporcionan células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican fusiones E7E6, así como células huésped que expresan o contienen los polipéptidos de fusión E7E6.

En otra realización más, la invención también proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un ácido nucleico o polipéptido de la invención y son útiles, por ejemplo, para tratar o prevenir cáncer cervical. Tales composiciones inmunogénicas pueden comprender (a) un polipéptido de la invención (por ejemplo, un polipéptido que comprende los polipéptidos E6 y E7 de virus del papiloma humano en los que el polipéptido E7 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 24, 26 y 91 de la SEC ID N° 14 y el polipéptido E6 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 63 y 106 de la SEC ID N° 13) y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, una composición inmunogénica de la invención también puede contener un adyuvante.

15 También se proporcionan virus recombinantes que contienen uno o más ácidos nucleicos de la invención y/o codifican uno o más de los polipéptidos de la invención. Por lo tanto, por ejemplo, un virus recombinante de la invención comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se expone en las SEC ID N° 9 u 11, y más particularmente que tiene la secuencia expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 10 ó 12. En una realización particularmente preferida, un virus recombinante de la invención es un virus de encefalitis equina venezolana (VEEV) modificado.

Se proporcionan adicionalmente procedimientos para usar las composiciones anteriormente mencionadas. Por lo tanto, se proporciona también un procedimiento para producir una respuesta inmune en un individuo administrando a ese individuo cantidades inmunológicamente eficaces de un polipéptido de la invención (por ejemplo, uno que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 9 u 11) y un vehículo farmacéuticamente eficaz.

También se proporcionan procedimientos para tratar y/o prevenir cáncer cervical. Por ejemplo, procedimientos para tratar cáncer cervical en los que se administra a un paciente al que se le ha diagnosticado cáncer cervical un polipéptido de la invención (por ejemplo, uno que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 9 u 11) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se proporcionan además procedimientos para evitar cáncer cervical en los que se administran un polipéptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un individuo. La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar y/o prevenir cáncer cervical en un paciente administrando al paciente una cantidad inmunológicamente eficaz de un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, uno que tenga una secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N° 9 u 11, particularmente expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 10 ó 12).

35 **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A y 1B son diagramas esquemáticos que muestran la localización de las mutaciones puntuales introducidas en proteínas E6 y E7 de VPH16 en relación con epítomos potenciales para los alelos de HLA-A de Clase I principales. La Figura 1A muestra los aminoácidos de origen natural en B6, ⁶³C y ¹⁰⁶C, que se mutaron cada uno a glicina. La Figura 1B muestra los aminoácidos de origen natural en E7, ²⁴C, ²⁶E y ⁹¹C, que se mutaron cada uno a glicina. Se muestran epítomos de clase I definidos previamente capaces de unirse a alelos HLA-A1, A2, A3, A11 y A24 en cajas punteadas (Kast, W.M. y col., J Immunol 1994,152: 3904-3912).

Las Figuras 2A-E son esquemas que muestran el alineamiento y la secuencia consenso de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos E6 de virus del papiloma humano 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (SEC ID N° 15-26, respectivamente). La secuencia consenso (SEC ID N° 39) se muestra bajo el alineamiento. Las letras en mayúscula en la secuencia consenso indican consenso completo y las letras en minúscula en la secuencia consenso indican alta frecuencia pero no consenso completo.

Las Figuras 3A-C son esquemas que muestran el alineamiento y la secuencia consenso de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos E7 de virus del papiloma humano 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (SEC ID N° 27-38, respectivamente). La secuencia consenso (SEC ID N° 40) se muestra bajo el alineamiento. Las letras en mayúsculas en la secuencia consenso indican consenso completo y las letras en minúsculas en la secuencia consenso indican alta frecuencia, pero no consenso completo.

Las Figuras 4A y 4B son gráficas que muestran porcentaje de lisis específica frente a relación de célula efectora y diana (E:T), que representa las respuestas CTL después de inmunización con VRP. Los ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía subcutánea con 3 x 10⁵ UI de la VRP indicada, y se realizaron ensayos CTL un mes después. La citotoxicidad se midió mediante liberación de Europio de células diana MC57G infectadas con MVA-E7 (A) o E6-MVA (B). Estos resultados se reprodujeron en dos experimentos adicionales (datos no mostrados).

Las Figuras 5A y 5B son gráficas que demuestran el porcentaje de ratones sin tumores frente al número de días después de la exposición a tumor. Los ratones C57BL/6 ($n = 8/\text{gp}$) se sensibilizaron y reforzaron con 3×10^5 UI de la composición inmunogénica de VRP indicada los días -21 y -7 y se expusieron el día 0 a 5×10^5 células tumorales C3 (A) o 5×10^4 células tumorales TC-1 (B) en el flanco. Los tumores se supervisaron cada 3 días.

La Figura 6 es una gráfica que demuestra el porcentaje de ratones sin tumores frente al número de días después de la exposición a tumor. Los ratones C57BL/6 ($n = 8-16/\text{gp}$) recibieron 5×10^5 células tumorales C3 el día 0 y se inmunizaron con la VRP indicada los días 7, 14 y 21. Los tumores se supervisaron durante 3 días durante 45 días.

La Figura 7 es una gráfica que demuestra el porcentaje de ratones sin tumores frente al número de días después de la exposición a tumor. Los ratones transgénicos HLA-A*0201 ($n = 10/\text{gp}$) recibieron 2×10^6 células tumorales HLF16 el día 0 y se inmunizaron con la VRP indicada los días 5, 10 y 15. Los tumores se supervisaron cada 5 días.

Las Figuras 8A y 8B son transferencias de Western que detectan expresión de p53 (A) y Rb (B) en células epiteliales mamarias (MEC) humanas primarias infectadas con diferentes preparaciones de VRP. Veinticuatro horas después de la infección con la VRP indicada ($\text{MOI} = 10$); se procesaron 25 μg de cada lisado de células MEC en SDS-PAGE, se transfirieron y se exploraron con respecto a niveles de p53 (A) y Rb (B). La carga proteica equivalente se verificó explorando con anticuerpo anti-tubulina. La presencia de proteínas E7 se verificó explorando los carriles indicados con un anticuerpo anti-E7.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona fusiones de proteínas E6 y E7 de VPH, las secuencias de nucleótidos que codifican ejemplos de tales fusiones y formas mutantes de las mismas. Aunque cada una de las mutaciones específicas de VPH16 identificada en el presente documento (con la excepción de E6 C106G, que sólo se había mutado previamente a C106R (Dalal y col., J Virol 1996, 70: 683-8)) se ha desvelado previamente, no se han realizado combinaciones de estas mutaciones y no se han ensayado combinaciones de estas mutaciones con respecto a su capacidad para conservar inmunogenicidad careciendo a la vez de capacidad de transformación o inmortalización. Por ejemplo, no se supo si cualquier otra combinación de dos o más mutaciones daría como resultado polipéptidos que mantuvieran su eficacia inmunogénica. La presente invención desvela fusiones de proteínas E7E6 que contienen combinaciones únicas de estas mutaciones y el sorprendente hallazgo de que proteínas de fusión E7E6 que contenían cuatro o cinco mutaciones definidas mantienen su eficacia inmunogénica. Este hallazgo es particularmente importante debido a que una composición inmunogénica terapéutica debería generar respuestas celulares óptimas frente a numerosos péptidos antigénicos E6 y E7 de VPH para cobertura eficaz en poblaciones diversas de LHA. La presente invención desvela también que estas fusiones E7E6 que portan múltiples mutaciones, manteniendo a la vez su eficacia inmunológica, no mantienen las funciones necesarias para capacidad de transformación de E6 y E7, concretamente degradación de p53 y pRB. Específicamente, las fusiones de la presente invención no inducen degradación de p53 o Rb y, por lo tanto, son más seguras que sus homólogos no mutantes para suministro o expresión en un paciente.

La presente invención también desvela el sorprendente hallazgo de que las fusiones E7E6, que son fusiones en las que E6 está carboxilo terminal de E7, tiene actividad inmunológica aumentada en comparación con sus homólogos E6E7.

En ejemplos específicos, se produjeron proteínas de fusión E6E7 y E7E6 de VPH16 y se ensayaron con respecto a inmunogenicidad y respuestas antitumorales. Se introdujeron varias mutaciones puntuales en los genes de E6 y E7 para inactivar su potencial oncogénico, conservando a la vez epítomos de HLA conocidos. Se observaron respuestas de CTL comparables al epítipo E7₄₉₋₅₇ restringido con H-2D^b entre ratones inmunizados con 3×10^5 unidades infecciosas de VRP que codifican proteínas de fusión mutantes o de tipo silvestre. Todas las composiciones inmunogénicas de VRP que expresan proteína de fusión mutante y wt erradicaron tumores C3 establecidos durante 7 días en 90 % o más de los ratones. Además, las construcciones de fusión E6E7 demostraron eficacia antitumoral en otros dos modelos de tumores positivos para E6E7. Específicamente, las VRP de E7E6 TetM confirieron rechazo tumoral completo en el modelo de tumor HLF16. Las células epiteliales mamarias humanas primarias infectadas con VRP que expresaban genes de E6 y B7 mutantes, pero no de tipo silvestre, demostraron niveles normales de proteínas tanto p53 como retinoblastoma.

Las fusiones E7E6 de la invención

La presente invención proporciona polipéptidos de fusión E7E6 que comprenden las mutaciones múltiples C24G, E26G y C91G en E7 y C63G y C106G en E6 (véase Figuras 1A y B). Por ejemplo, los polipéptidos de fusión E7E6TetM comprenden las mutaciones C24G y E26G de E7 y las mutaciones C63G y C106G de E6, mientras que los polipéptidos de fusión E7E6PentM comprenden la mutación C91G de E7 además de las cuatro mutaciones presentes en los mutantes TetM. Estos polipéptidos de fusión mutados, entre otros, pueden ser inestables. Los expertos habituales en la materia aprecian que las proteínas inestables, en comparación con proteínas estables,

tiene una capacidad aumentada para desarrollar respuestas de CTL. Los expertos en la materia también apreciarán que las proteínas de fusión tienden a no plegarse de forma apropiada y por lo tanto son menos estables que sus homólogos no fusionados. Por lo tanto, las propiedades de fusión tales como las desveladas en la presente invención, están mejor adaptadas para la producción de respuestas inmunes mediadas por células que sus homólogos no fusionados.

Se produjeron proteínas de fusión E6E7 y E7E6 de VPH16 y se ensayaron con respecto a inmunogenicidad y respuestas antitumorales. Se introdujeron varias mutaciones puntuales en los genes E6 y E7 para inactivar su potencial oncogénico, conservando a la vez epítopos de HLA conocidos. Antes de la presente invención no se sabía si las combinaciones de las mutaciones ensayadas en el presente documento destruirían la inmunogenicidad de los polipéptidos o si tales polipéptidos mutados conservarían su inmunogenicidad. Se observaron respuestas de CTL comparables al epítipo E7₄₉₋₅₇ restringido con H-2D^b entre ratones inmunizados con 3×10^5 unidades infecciosas de VRP que codifican proteínas de fusión mutante o de tipo silvestre. Todas las composiciones inmunogénicas de VRP que expresan proteína de fusión mutante y de tipo silvestre erradicaron tumores C3 establecidos durante 7 días en 90 % o más de los ratones. Además, las construcciones de fusión E6/E7 demostraron eficacia antitumoral en otros dos modelos de tumores positivos para E6E7.

La presente invención proporciona polipéptidos de fusión que comprenden E6 y E7, en los que E6 está en el extremo carboxilo terminal. Los expertos en la materia reconocerán a partir de la presente divulgación que las fusiones en las que E6 está carboxilo terminal de E7 (fusiones E7E6), es decir E6 sigue a E7, tales como E7E6TetM y E7E6PentM, tendrán eficacia inmunológica aumentada en comparación con fusiones en las que E6 está amino terminal de E7 (fusiones E6E7, tales como B6E7TetM y E6E7PentM). Además, reconocerán los expertos en la materia que las fusiones E7E6, es decir, fusiones en las que E6 es carboxilo terminal de E7, tendrán actividad E6 reducida en comparación con fusiones E6E7. Por lo tanto, se espera en general que las fusiones E7E6 sean más seguras. En consecuencia, las fusiones en las que E6 está carboxilo terminal de E7 son una realización de la presente invención.

La presente invención proporciona ejemplos de mutaciones de nucleótidos y aminoácidos particulares en posiciones correspondientes a C24, E26 y en C91 de E7 de VPH16 y C63 y C106 de E6 de VPH16. Por ejemplo, la presente invención proporciona cisteína 24 para mutar a glicina (la mutación correspondiente en la secuencia de nucleótidos es CTG a CGG). Estos ejemplos no son limitantes. Por ejemplo, pueden usarse mutaciones que dieron como resultado de forma similar interrupción de los dedos de zinc o unión de Rb. Por ejemplo, las mutaciones en restos de cisteína importantes para formación de dedos de zinc pueden cambiarse a cualquier otro aminoácido. Las mutaciones preferidas dan como resultado una desestabilización de la proteína y, por lo tanto, un aumento de la inmunogenicidad de la proteína.

En una realización específica de la invención, los polipéptidos son fusiones de E6 y E7 de VPH16 en los que el polipéptido E7 tiene mutaciones en el aminoácido o los aminoácidos correspondientes a las posiciones 24, 26 y 91 de la SEC ID N° 14 y el polipéptido E6 tiene mutaciones en uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones 63 y 106 de la SEC ID N° 13. En una realización preferida de la invención, los polipéptidos son fusiones de E6 y E7 de VPH16 en las que el polipéptido E7 tiene mutaciones en aminoácidos correspondientes a las posiciones 24 y 26 de la SEC ID N° 14 y el polipéptido E6 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones 63 y 106 de la SEC ID N° 13.

Se entiende en la técnica que el número de aminoácidos se determina contando metionina como el primer aminoácido, incluso en caso de que la primera metionina se haya suprimido en la segunda de las proteínas de fusión. Por ejemplo, se considera que la mutación G24 de E6E7TetM (SEC ID N° 3) está en el resto 24 del polipéptido E7m.

En otra realización preferida de la presente invención, los polinucleótidos son fusiones de polinucleótidos E6 y E7 de VPH16 en las que el polinucleótido E6 tiene mutaciones en cualquiera de los nucleótidos 187-189 (que corresponde a los nucleótidos 290-292 del genoma de VPH16 (número de acceso de GenBank K02718)) y 1316-1318 (que corresponde a los nucleótidos 419-421 del genoma de VPH16) y la secuencia de nucleótidos de E7 tiene mutaciones en cualquiera de los nucleótidos 70-72 (que corresponde a los nucleótidos 631-633 del genoma de VPH16), 76-78 (que corresponde a los nucleótidos 637-639 del genoma de VPH1-6) y 271-273 (que corresponde a los nucleótidos 832-834 del genoma de VPH16). Estos cambios de nucleótidos dan como resultado mutaciones de sentido erróneo, no mutaciones sin sentido. En otras palabras, estas mutaciones dan como resultado que se codifique un aminoácido diferente.

La presente invención proporciona polipéptidos, y composiciones inmunogénicas y farmacéuticas que comprenden estos polipéptidos, o que comprenden nucleótidos que codifican estos polipéptidos. Como se describe más adelante estos polipéptidos y polinucleótidos se describen en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido E6E7TetM se describe en SEC ID N° 3. Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas de la presente divulgación no están limitadas a las secuencias exactas desveladas en la presente solicitud. Por ejemplo, las secuencias E6 y E7 se obtuvieron realizando PCR a partir del clon de ATCC N° 45113 de VPH16. Las secuencias de E6 y E7 de este clon de ATCC varían ligeramente de las de la secuencia de VPH16 de GenBank, K02718. Por lo tanto, los expertos en la materia apreciarán que la presente

divulgación también comprende secuencias de aminoácidos y nucleótidos sustancialmente similares o sustancialmente homólogas de las desveladas en el presente documento y que la combinación de mutaciones descritas puede producirse en el fondo de cualquier secuencia de E6 o E7. Por ejemplo, estas mutaciones y cualquier número de combinaciones de estas mutaciones pueden estar en el contexto de las secuencias de E6 y E7 desveladas en K02718.

Los expertos en la materia apreciarán que la presente divulgación también puede aplicarse a los otros miembros de la familia del virus de papiloma además de VPH16. Otros genotipos de virus de papiloma asociado con cáncer, en particular, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 tienen motivos conservados en sus proteínas E6 y E7 que son probablemente centrales para su capacidad oncogénica (véase Fields Virology cuarta edición, 2001, C. 65 y 66, 2197-2265, Knipe & Howley Eds., Lippincott Williams y Wilkins). Resulta notable que estas proteínas E6 y E7 tienen motivos de dedos de zinc C-X-X-C y, para E7, un motivo de unión a Rb potencial L-X-C-X-E. Por lo tanto, una realización de la presente divulgación comprende polipéptidos de fusión E6 y E7 y polinucleótidos de otros miembros de la familia del virus del papiloma humano, que tienen mutaciones que corresponden con las mutaciones desveladas en la presente invención.

Pueden determinarse aminoácidos y nucleótidos que corresponden a las posiciones de los aminoácidos y nucleótidos particulares desvelados en las SEC ID N° 1-12 realizando un alineamiento de secuencias. Se muestran ejemplos de tales alineamientos de secuencias en las Figuras 2A-E y 3A-C. En estas figuras, los aminoácidos de los polipéptidos E6 y E7 de los VPH 18, 31, 33, 35, 39, 45; 51, 52, 56; 58, 59 y 68 se han alineado, y se presentan secuencias consenso. La secuencia de aminoácidos consenso de E6 se representa en la SEQ ID N° 39 y la secuencia de aminoácidos consenso de E7 se representa en la SEC ID N° 40.

Estos alineamientos demuestran que cada una de las mutaciones ensayadas en la presente invención se conserva en cada uno de estos virus VPH y, por lo tanto, también pueden mutarse para suprimir su potencial oncogénico, manteniendo a la vez su capacidad para inducir una respuesta inmune. Se conservan con frecuencia aminoácidos que están implicados en la formación de estructuras tales como dedos de zinc y motivos de unión. Se pueden, por ejemplo, identificar y mutar los aminoácidos o nucleótidos conservados que corresponden a los aminoácidos 24, 26 y 91 de B7 de VPH16 y a los aminoácidos 63 ó 106 de E6 de VPH16 en cada uno de los miembros de los genotipos de VPH. Por ejemplo, el alineamiento mostrado en las Figuras 2A-E demuestra que el aminoácido de E6 de VPH18 que corresponde al aminoácido 63 de E6 de VPH16 (⁶³C) también es un resto de cisteína y que está en la posición 65 de E6 de HPV18. En consecuencia, ⁶⁶C de E6 de HPV18, además de otros restos que corresponden a los aminoácidos 24, 26 y 91 de E7 de VPH16 y el aminoácido 106 de E6 de VPH16, pueden mutarse en la presente invención. De forma similar, pueden realizarse mutaciones en cualquier polipéptido E6 de VPH correspondiente a los aminoácidos 65 ó 108 de la secuencia consenso de E6 (SEC ID N° 39) o en cualquier polipéptido E7 de VPH correspondiente a los aminoácidos 25, 27 ó 97 de la secuencia consenso de E7 (SEC ID N° 40) en la presente invención.

En una realización de la presente invención, los polipéptidos de fusión comprenden cuatro de estas mutaciones. En otra realización más, estos polipéptidos de fusión comprenden las cinco de estas mutaciones.

Definiciones de Biología Molecular. De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante convencionales dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (denominado en el presente documento "Sambrook y col., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. 1986); immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B.E. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Los polinucleótidos del presente documento pueden flanquearse por secuencias reguladoras naturales, o pueden asociarse con secuencias heterólogas, incluyendo promotores, potenciadores, elementos de respuesta, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificantes 5' y 3' y similares. Los ácidos nucleicos también pueden modificarse por muchos medios conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones incluyen metilación, "recubrimientos", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural (es decir, optimización de codones de la base "oscilante" inicial o tercera), y modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, los que tienen enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.). Los polinucleótidos pueden contener uno o más restos unidos covalentemente adicionales, tales como proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, de hierro, metales oxidantes, etc.) y alquilantes por nombrar algunos. Los polinucleótidos pueden derivatizarse mediante formación de un enlace metil o etil fosfotriéster o uno alquil fosforamidita. Además, los polinucleótidos del presente documento también pueden modificarse con un marcador capaz de proporcionar una señal detectable, directa o indirectamente. Los marcadores ejemplares incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina y similares. Otros ejemplos no limitantes de modificación que puede realizarse se proporcionan, más adelante, en la descripción de la presente invención.

El término gen, también denominado un “gen estructural” significa una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de aminoácidos que comprende toda o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede incluir o no secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones en las que se expresa el gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden transcribirse de ADN a ARN, pero no se traducen en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden actuar como reguladores de genes estructurales o como reguladores de la transcripción de ADN.

Una “secuencia codificante” o una secuencia que “codifica” un polipéptido, proteína o enzima es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Preferentemente, la secuencia codificante es una secuencia de ARN que se traduce a un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio cerca del extremo 5' terminal y un codón de parada de traducción cadena abajo. Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero) e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia codificante se pretende para expresión en una célula eucariota, se localizarán habitualmente una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción 3' de la secuencia codificante.

Son secuencias de control de la transcripción y de la traducción secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped. En células eucariotas, las señales de poliadenilación son secuencias de control. Las “secuencias de control de la expresión” son las secuencias de control de la transcripción implicadas en el inicio de la transcripción, tales como promotores y potenciadores.

Una “secuencia promotora” es una región reguladora de ADN capaz de unirse a ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección 3'). Para fines de definir la presente invención, la secuencia promotora se une en su extremo 3' terminal con el sitio de inicio de la transcripción y se extiende cadena arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesario para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Como se ha descrito anteriormente, el ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula o media o controla de otro modo la expresión del ADN codificante.

La amplificación de un polinucleótido, como se usa en el presente documento, indica el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para aumentar la concentración de una secuencia de ADN particular dentro de una mezcla de secuencias de ADN. Para una descripción de PCR véase Saiki y col., Science 1988, 239:487.

Los términos “expresar” y “expresión” significan permitir o provocar que la información en un gen o secuencia de ADN se manifieste, por ejemplo, produciendo una proteína por activación de las funciones celulares implicadas en transcripción y traducción de una secuencia de ADN o gen correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un “producto de expresión” tal como una proteína. También puede decirse que el producto expresión en sí mismo, por ejemplo, la proteína resultante, se “expresa” por la célula. Un polinucleótido o polipéptido se expresa de forma recombinante, por ejemplo, cuando se expresa o produce en una célula huésped ajena bajo el control de un promotor ajeno o nativo, o en una célula huésped nativa bajo el control de un promotor ajeno.

El término “transfección” significa la introducción de un ácido nucleico ajeno en una célula. El término “transformación” significa la introducción de un gen “ajeno” (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN a una célula huésped, de modo que la célula huésped exprese el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. El gen o secuencia introducido, que también puede llamarse gen o secuencia “clonado” o “ajeno”, puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como secuencias de inicio, parada, promotora, señal, de secreción u otras usadas por la maquinaria genética de una célula. El gen o secuencia puede incluir secuencias no funcionales o secuencias sin función conocida. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha “transformado” y es un “transformante” o un “clon”. El ADN o ARN introducido en una célula huésped puede venir de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula huésped, o células de un género o especie diferente.

Los términos “vector” y “vector de expresión” significan el vehículo por el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen ajeno) puede introducirse en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión de un polipéptido (por ejemplo transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Los vectores normalmente comprenden el ADN de un agente transmisible, en el que se inserta ADN ajeno. Un modo común para insertar un segmento de ADN en otro segmento de ADN implica el uso de enzimas llamadas enzimas de restricción que escinden ADN en sitios específicos (grupos específicos de nucleótidos) denominados sitios de restricción. Generalmente, se inserta ADN ajeno en uno o más sitios de restricción del ADN de vector, y después se lleva por el vector a una célula huésped junto con el ADN de vector transmisible. En un segmento o secuencia de ADN que tenga ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también puede denominarse una “construcción de ADN”.

Un tipo de vector común es un “plásmido”, que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario. Un plásmido puede aceptar fácilmente ADN adicional (ajeno) y que puede introducirse fácilmente en una célula huésped adecuada. Un vector plasmídico con frecuencia contiene ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN ajeno. El ADN promotor y ADN codificante pueden ser del mismo gen o de diferentes genes, y pueden ser del mismo o diferentes organismos. Se ha descrito una gran variedad de vectores, incluyendo vectores plasmídicos y fúngicos para replicación y/o expresión en una diversidad de huéspedes eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitantes incluyen plásmidos pKK (Clontech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, WI), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, CA), o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y muchas células huésped apropiadas, usando procedimientos desvelados o citados en el presente documento o conocidos de otro modo por los expertos en la materia relevante. Los vectores de clonación recombinantes con frecuencia incluirán uno o más sistemas de replicación para clonación o expresión, uno o más marcadores para selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos y uno o más casetes de expresión. La experimentación rutinaria en biotecnología puede usarse para determinar qué vectores de clonación son más adecuados para su uso con la invención. En general, la selección de vector de clonación depende del tamaño de la secuencia polinucleotídica y las células huésped para usar.

Un “polipéptido” es una cadena de componentes básicos químicos denominados aminoácidos que se unen entre sí por enlaces químicos llamados “enlaces peptídicos”. El término “proteína” se refiere a polipéptidos que contienen los restos de aminoácidos codificados por un gen o por una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ARNm o un ADNc) transcritos de ese gen directa o indirectamente. Opcionalmente, una proteína puede carecer de ciertos restos de aminoácidos que están codificados por un gen o por un ARNm. Una proteína o polipéptido, incluyendo una enzima, puede ser “nativa” o “de tipo silvestre”, lo que significa que aparece en la naturaleza; o puede ser un “mutante”, “variante” o “modificado”, lo que significa que se ha preparado, alterado, derivado o es de alguna forma diferente o se ha cambiado de una proteína nativa o de otro mutante.

“Mutación” significa cualquier procedimiento o mecanismo que dé como resultado una proteína, enzima, polipéptido, polinucleótido, gen o célula mutante. Esta incluye cualquier mutación en la que se altere una proteína, enzima, polinucleótido o secuencia génica y cualquier cambio detectable en una célula que surja de una mutación tal. La proteína, enzima, polipéptido, polinucleótido alterado es un “mutante”, también denominado una “variante”. Normalmente, una mutación se produce en una secuencia génica o polinucleotídica, por mutaciones puntuales (sustituciones), deleciones o inserciones de restos de nucleótidos múltiples o sencillos. Una mutación incluye alteraciones polinucleotídicas que surgen dentro de una región que codifica una proteína de un gen así como alteraciones en regiones fuera de una secuencia codificante de proteína, tal como, pero sin limitación, secuencias reguladoras o promotoras. Una mutación en un gen puede ser “silenciosa”, es decir, no se refleja en una alteración de aminoácidos tras su expresión, lo que conduce a una variante “conservativa para secuencia” del gen. Esta surge generalmente cuando un aminoácido corresponde a más de un codón. La Tabla 1 perfila qué aminoácidos corresponden a qué codones.

Por lo tanto, debido a la degeneración del código genético, cualquier codón de tres nucleótidos que codifique un resto de aminoácido mutado de un polipéptido de fusión E6/E7 descrito en el presente documento está dentro del alcance de la invención.

Los términos “mutante” y “variante” también pueden usarse para indicar un gen modificado o alterado, secuencia de ADN o ARN, enzima, célula, etc., es decir, cualquier tipo de mutante. Tales cambios también incluyen cambios en el promotor, sitio de unión a ribosomas, etc.

La expresión “secuencias de aminoácidos variantes” se refiere a otros polipéptidos de fusión de E6 y E7 adecuados que pueden diferir de los polipéptidos de fusión de E6 y E7 ejemplificados específicamente por modificaciones que no reduzcan la inmunogenicidad. En la preparación de tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva en un polipéptido generalmente se entiende en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y da como resultado aún un polipéptido con actividad biológica similar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobicidad y carga. Esos índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se cree que el relativo carácter hidropático del resto de aminoácido determina la estructura secundaria y terciaria del polipéptido resultante, que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos y similares. Se sabe en la técnica que un aminoácido puede sustituirse por otro aminoácido que tenga un índice hidropático similar y obtener aún un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de +/-2, se prefieren particularmente los de +/-1, y se prefieren más particularmente los de +/-0,5.

También puede realizarse sustitución de aminoácidos similares basándose en la hidrofilia, particularmente cuando el

polipéptido o péptido biológicamente funcional equivalente creado de este modo se pretende para su uso en realización inmunológica. La patente de Estados Unidos N° 4.554.101, indica que la mayor hidrofiliía media local de un polipéptido, regida por la hidrofiliía de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica del polipéptido.

- 5 Como se detalla en la patente de Estados Unidos N° 4.554.101, los siguientes valores de hidrofiliía se han asignado a restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +/-1), glutamato (+3,0 +/-1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5, +/-1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituir a otro que tenga un valor de hidrofiliía similar y
- 10 obtener aún un polipéptido biológicamente equivalente y, en particular, uno inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliía están dentro de +/-2; se prefieren particularmente los que están dentro de +/-1; y se prefieren aún más particularmente los que están dentro de +/-0,5.

- 15 Como se ha perfilado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan en general en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliía, carga, tamaño y similares. Se conocen bien por los expertos en la materia sustituciones ejemplares que tienen en consideración varias de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato, serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

- 20 Las "variantes conservativas de función" son proteínas o enzimas en las que se ha cambiado un resto de aminoácido dado sin alterar la conformación estructural global y función específica de la proteína o enzima. Esto incluye pero sin limitación, reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades físicas o estructurales similares, incluyendo carácter polar o no polar, tamaño, forma y carga (véase, por ejemplo, Tabla 1).

TABLA 1

Aminoácidos, Codones Correspondientes y Funcionalidad/Propiedad			
Aminoácido	CUL	Codones de ADN	Propiedad de Cadena Lateral
Isoleucina	I	ATT, ATC, ATA	Hidrófobo
Leucina	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG	Hidrófobo
Valina	V	GTT, GTC, GTA, GTG	Hidrófobo
Fenilalanina	F	TTT, TTC	Cadena lateral aromática
Metionina	M	ATG	Grupo de azufre
Cisteína	C	TGT, TGC	Grupo de azufre
Alanina	A	GCT, GCC, GCA, GCG	Hidrófobo
Glicina	G	GGT, GGC, GGA, GGG	Hidrófobo
Prolina	P	CCT, CCC, CCA, CCG	Amina secundaria
Treonina	T	ACT, ACC, ACA, ACG	Hidroxilo alifático
Serina	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	Hidroxilo alifático
Tirosina	T	TAT, TAC	Cadena lateral aromática
Triptófano	W	TGG	Cadena lateral aromática
Glutamina	Q	CAA, CAG	Grupo amida
Asparagina	N	AAT, AAC	Grupo amida
Histidina	H	CAT, CAC	Cadena lateral básica
Ácido glutámico	E	GAA, GAG	Cadena lateral ácida
Ácido aspártico	D	GAT, GAC	Cadena lateral ácida
Lisina	K	AAA, AAG	Cadena lateral básica
Arginina	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Cadena lateral básica
Codones de parada	Parada	TAA, TAG, TGA	-

- 25 Como se denomina en el presente documento, "similitud de secuencia" significa el grado en que están relacionadas las secuencias de nucleótidos o proteínas. El alcance de similitud entre dos secuencias puede basarse en el porcentaje de identidad de secuencia y/o conservación. Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima de modo que el porcentaje de similitud de secuencia de aminoácidos o proteína entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, al menos el 70 %, aún más preferentemente el 80 %, y más preferentemente al menos el 90 %, como se determina de
- 30 acuerdo con un esquema de alineamiento.

"Identidad de secuencia" en el presente documento significa el grado en que dos secuencias de nucleótidos o

aminoácidos son invariantes.

Dos secuencias de ADN son sustancialmente homólogas o sustancialmente similares cuando al menos aproximadamente el 80 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 o 95 % de los nucleótidos coinciden sobre la longitud definida de las secuencias de ADN, como se determina por algoritmos de comparación de secuencia, tales como BLAST, FASTA, DNA Strider, etc. Un ejemplo de una secuencia tal es una variante alélica o de especie de los genes específicos de la invención. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando software convencional disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas como se definen para ese sistema particular.

- 10 De forma similar, dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente homólogas o sustancialmente similares cuando más del 80 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90 % son similares. Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineamiento de secuencias.

Son variantes conservativas de secuencia de una secuencia polinucleotídica en las que un cambio de uno o más nucleótidos dentro de un codón dado no da como resultado alteración en el aminoácido codificado por ese codón.

- 15 “Alineamiento de secuencias” significa el procedimiento de alinear dos o más secuencias para conseguir niveles máximos de identidad de secuencia (y, en el caso de secuencias de aminoácidos, conservación), por ejemplo, para el fin de evaluar el grado de similitud de secuencia. Se conocen numerosos procedimientos para alinear secuencias y evaluar la similitud y/o identidad en la técnica tales como, por ejemplo, el Procedimiento de Agrupamiento, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN, así como BLASTN, BLASTP y FASTA (Lipman y Pearson, 1985; Pearson y Lipman, 1988). Cuando se usan todos estos programas, los ajustes preferidos son los que dan como resultado la mayor similitud de secuencia.

- 25 El término “heterólogo” se refiere a una combinación de elementos no de origen natural. Por ejemplo, ADN heterólogo se refiere a ADN que no se localiza de forma natural en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. Preferentemente, el ADN heterólogo incluye un gen ajeno a la célula. Un elemento regulador de la expresión heterólogo es un elemento regulador asociado operativamente con un gen diferente del gen con el que se asocia operativamente en la naturaleza.

- 30 Las modificaciones, que normalmente no alteran la secuencia primaria de los polipéptidos de fusión de E6 y E7, incluyen derivatización química *in vivo* o *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, metilación o carboxilación. También se incluyen como polipéptidos variantes de la presente invención estos polipéptidos modificados por glucosilación, por ejemplo, los preparados modificando los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; o exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan a la glucosilación, tales como enzimas de glucosilación o desglucosilación de mamíferos. También se abarcan como polipéptidos variantes las secuencias mutadas anteriormente identificadas, que tienen restos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

- 35 La expresión “célula huésped” significa cualquier célula de cualquier organismo que se seleccione, modifique, transforme, cultive o use o manipule de cualquier modo, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo la expresión por la célula de un gen, una secuencia de ADN o ARN, una proteína o una enzima.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término aislado significa que el material referido se retira del ambiente en el que normalmente se encuentra. Por lo tanto, un material biológico aislado puede estar sin componentes celulares, es decir, componentes de las células en los que el material se encuentra o produce. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, un ARNm aislado, un ADNc, o un fragmento de restricción. En otra realización, se escinde preferentemente un ácido nucleico aislado del cromosoma en el que puede encontrarse, y más preferentemente no se une ya a regiones no reguladoras, no codificantes, o a otros genes, localizados cadena arriba o cadena abajo del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentran en el cromosoma. En otra realización más, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares. Por lo tanto, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede asociarse con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambas, con las que se asocia en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado se retira del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede ser, pero no necesita ser, purificado.

- 55 El término “purificado” como se usa en el presente documento se refiere a un material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales nativos de los que se obtiene el material. Por ejemplo, una proteína purificada está sustancialmente sin otras proteínas o ácidos nucleicos con los que se asocia en una célula; una molécula de ácido nucleico purificada está preferentemente sustancialmente sin proteínas u otras moléculas de ácido nucleico no relacionadas con las que puede encontrarse dentro de una célula. Como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente sin” se usa de forma operativa, en el contexto de ensayos analíticos del material. Preferentemente, el material purificado

sustancialmente sin contaminantes es al menos el 50 % puro; más preferentemente, al menos el 90 % puro y más preferentemente aún al menos el 99 % puro. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico y otros procedimientos conocidos en la técnica.

Los procedimientos para purificación son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden purificarse ácido nucleicos por precipitación, cromatografía (incluyendo cromatografía de fase sólida preparatoria, hibridación de oligonucleótidos, y cromatografía de triple hélice), ultracentrifugación y otros medios. Los polipéptidos y proteínas pueden purificarse por diversos procedimientos incluyendo, sin limitación, electroforesis en gel de disco preparatorio, isoelectroenfoque, HPLC, HPLC de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y partición, cromatografía de precipitación e insolubilización por salado, extracción y distribución contra corriente. Para algunos fines, es preferible producir el polipéptido en un sistema recombinante en el que la proteína contiene un marcador de secuencia adicional que facilita la purificación, tal como, pero sin limitación, una secuencia de polihistidina, o una secuencia que se une específicamente a un anticuerpo, tal como FLAG y GST. El polipéptido puede después purificarse a partir de un lisado de un huésped de las células huésped por cromatografía en una matriz de fase sólida apropiada. Como alternativa, los anticuerpos producidos contra la proteína o contra péptidos derivados de la misma pueden usarse como reactivos de purificación. Las células pueden purificarse por diversas técnicas, incluyendo centrifugación, separación en matriz (por ejemplo, separación en lana de nylon), selección y otras técnicas de inmunoselección, empobrecimiento (por ejemplo, empobrecimiento del complemento de células contaminantes), y separación de células (por ejemplo, separación de células activadas por fluorescencia [FACS]). Son posibles otros procedimientos de purificación. Un material purificado puede contener menos de aproximadamente el 50 %, preferentemente menos de aproximadamente el 75 %, y más preferentemente menos de aproximadamente el 90 %, de los componentes celulares con los que se asoció originalmente. El "sustancialmente puro" indica el mayor grado de pureza que puede conseguirse usando técnicas de purificación convencionales conocidas en la materia.

Los polinucleótidos son "hibridables" entre sí cuando al menos una hebra de un polinucleótido puede hibridar con otros polinucleótidos en condiciones de rigurosidad definida. La rigurosidad de hibridación se determina, por ejemplo, por la temperatura a la que se realiza la hibridación y/o el lavado, y b) la fuerza iónica y polaridad (por ejemplo, formamida) de las soluciones de hibridación y lavado, así como otros parámetros. La hibridación requiere que los dos polinucleótidos contengan secuencias sustancialmente complementarias; dependiendo de la rigurosidad de hibridación, sin embargo, pueden tolerarse emparejamientos erróneos. Normalmente, la hibridación de dos secuencias a alta rigurosidad (tal como, por ejemplo, en una solución acuosa de 0,5 x SSC a 65 °C) requiere que las secuencias muestren algún grado alto de complementariedad sobre su secuencia completa. Las condiciones de rigurosidad intermedia (tales como, por ejemplo, una solución acuosa de 2 X SSC a 65 °C) y rigurosidad baja (tales como, por ejemplo, una solución acuosa de 2 X SSC a 55 °C), requieren complementariedad menos global correspondiente entre las secuencias hibridantes (1 X SSC es NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M). Los polinucleótidos que "hibridan" con los polinucleótidos en el presente documento pueden ser de cualquier longitud. En una realización, tales polinucleótidos son de al menos 10, preferentemente al menos 15 y más preferentemente al menos 20 nucleótidos de longitud. En otra realización, los polinucleótidos que hibridan son de aproximadamente la misma longitud. En otra realización, los polinucleótidos que hibridan incluyen los que hibridan en condiciones de rigurosidad adecuadas y que codifican polipéptidos o enzimas que tienen la misma función, tal como la capacidad para unirse a p53 (en el caso de E6) o de unirse a Rb (en el caso de E7).

Las técnicas y herramientas de ingeniería genética generales analizadas en el presente documento, incluyendo transformación y expresión, el uso de células huésped, vectores, sistemas de expresión, etc. se conocen bien en la materia.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa dentro del 50 % de un valor dado, preferentemente dentro del 20 %, más preferentemente dentro del 10 %, más preferentemente aún dentro del 5 % y más preferentemente dentro del 1 % de un valor dado. Como alternativa, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa que un valor puede quedar dentro de un intervalo de error científicamente aceptable para este tipo de valor, que dependerá de lo cualitativa que pueda ser una medición dadas las herramientas disponibles. "Aproximadamente" o "alrededor de" puede definir una distribución en torno a un valor medio, en lugar de un valor sencillo.

Las composiciones inmunogénicas y farmacéuticas de la invención

La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas y farmacéuticas que comprenden polipéptidos y polinucleótidos de fusión de E6 y E7 del virus del papiloma humano. Estas composiciones pueden usarse para tratar y/o prevenir cánceres inducidos por virus del papiloma, tales como cáncer cervical, y lesiones cervicales tales como CIN. Estas composiciones pueden usarse también para tratar cánceres del tracto gastrointestinal inferior, tales como cáncer anal, y otros cánceres del sistema reproductor, tales como cáncer de pene y vulva.

En una realización adicional, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas y farmacéuticas que comprenden fusiones de polipéptidos y fusiones de polinucleótidos de múltiples virus del papiloma. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas y farmacéuticas que comprenden fusiones de proteínas E6 y E7 de múltiples miembros de la familia de VPH tales como VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Se muestran ejemplos de polipéptidos E6 de VPH en las Figuras 2A-E y las secuencias de aminoácidos

de E6 de VPH 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 se exponen en SEC ID N°: 15-26, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos que codifican estos polipéptidos E6 de VPH se exponen en SEC ID N°: 42-53, respectivamente. Los ejemplos de polipéptidos E7 de VPH se muestran en las Figuras 3A-C y las secuencias de aminoácidos de E7 de VPH 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 se exponen en SEC ID N°: 27-38, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos que codifican estos polipéptidos E7 de VPH se exponen en SEC ID N°: 54-65, respectivamente. Estas fusiones contienen mutaciones en los restos identificados por alineamiento que corresponden a los restos mutados en VPH16 descritos en el presente documento o que corresponden a las secuencias conservadas como se muestra en las secuencias consenso de E6 y E7 (SEC ID N°: 39 y 40, respectivamente) que interfieren con la característica oncogénica de la proteína sin interferir con su capacidad para inducir una respuesta inmune. La presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas y farmacéuticas que comprenden una fusión que comprende polipéptidos E6 y E7 de diferentes miembros de la familia del virus del papiloma. Por ejemplo, una fusión puede comprender en una construcción sencilla cualquier combinación posible de E6 y E7 de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

El número de polipéptidos E7E6 presentes en una fusión están limitados solamente por las limitaciones de tamaño del mecanismo de suministro o vector en el que se suministren estas composiciones. Por ejemplo, los virus, restringidos por limitaciones estructurales, pueden empaquetar solamente una cantidad particular de ácido nucleico. Los expertos habituales en la materia apreciarán la capacidad de diferentes virus para empaquetar ácido nucleico y apreciarán que es rutinario explorar con respecto a ácidos nucleicos que son de tamaño apropiado para empaquetamiento.

Como alternativa, las composiciones inmunogénicas y farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender múltiples fusiones diferentes de E7E6. Por ejemplo, la composición inmunogénica o farmacéutica puede comprender múltiples partículas virales, conteniendo cada una diferentes fusiones de secuencias E6 y E7 de diferentes virus del papiloma.

Las composiciones inmunogénicas y farmacéuticas que comprenden fusiones de E7E6 de múltiples virus del papiloma son particularmente ventajosas porque generan una respuesta inmune a múltiples proteínas E6 y E7 y de este modo previenen cánceres y neoplasias provocados por cada uno de estos virus. Por ejemplo, cada uno de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 se ha asociado con carcinoma cervical y/o neoplasias intraepiteliales (Harrison's Principles of Internal Medicine Décima Quinta Edición, 2001, 1119; Braunwald y col., Eds., McGraw-Hill). Por lo tanto, una fusión de, por ejemplo, polipéptidos E6 y E7 de VPH16 y 18 proporcionaría prevención y tratamiento de cánceres de dos etiologías diferentes. Las composiciones que comprenden polipéptidos E6 y E7 de múltiples virus diferentes son un medio particularmente potente para tratar y/o prevenir una amplia serie de cánceres inducidos por virus del papiloma, tales como cáncer cervical, lesiones cervicales tales como CIN, cánceres del tracto gastrointestinal inferior, tales como cáncer anal, y otros cánceres del sistema reproductor, tales como cáncer de pene y vulva.

El experto en la materia apreciará procedimientos para determinar la seguridad de composiciones inmunogénicas. Los procedimientos ejemplares para determinar si, por ejemplo, las fusiones E7E6 tienen capacidad de transformación e inmortalización reducida o anulada incluyen: determinar los niveles de p53 y/o Rb mediante, por ejemplo, transferencia de Western, ensayos de agar blando, transfección de queratinocitos primarios, o células epiteliales de mamífero e identificación de pérdida de senescencia, y transfección de células e identificación de cambios en morfología celular. Además de estos ensayos funcionales, pueden usarse ensayos bioquímicos. Por ejemplo, puede medirse la unión de E6 y E7 con proteínas celulares tales como p53, E6 TP-1, telomerasa y Rb.

La evaluación de los niveles de p53 y Rb es un procedimiento para determinar la seguridad de partículas virales recombinantes, tales como VEE, que comprenden fusiones E7E6. Los niveles de estado estacionario de p53 y Rb en MEC humanas primarias se evaluaron después de infección con E6 y E7 de VPH16 de tipo silvestre que expresaba VRP, como proteínas de fusión o individuales, proteína de fusión E7E6 TetM o GFP como un control negativo. La infección por VRP de MEC reveló niveles reducidos en gran medida de p53 y Rb en cultivos que contienen formas de tipo silvestre de E6 y E7, respectivamente; la mera fusión de E7 con E6 no fue suficiente para alterar la actividad de ninguna de las proteínas (Figura 8A y B). Por el contrario, las MEC infectadas con VRP E7E6 TetM que contenían mutaciones de E6 (^{63}C y ^{106}C) y E7 (^{24}C y ^{26}E) contenían niveles normales de p53 y Rb (Figura 8A y B), lo que indica que estas cuatro mutaciones extinguieron la actividad oncogénica primaria de estas proteínas.

Debido a que la erradicación de tumores establecidos requiere la inducción de una respuesta inmune mediada por linfocitos T fuerte contra los antígenos virales específicos de tumor E6 y E7, se seleccionaron replicones de encefalitis equina venezolana (VEE) como el vector de composición inmunogénica. Sin embargo, puede usarse cualquier procedimiento de suministro de genes o proteínas para suministrar y empaquetar las composiciones inmunogénicas de la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse otros vectores virales conocidos por los expertos en la materia o los nucleótidos que codifican los polipéptidos de fusión mutantes pueden suministrarse directamente por un plásmido.

Los vectores AV recombinantes, de los que VEE es un miembro, son particularmente versátiles porque pueden lanzarse como ARN desnudo, ADN plasmídico desnudo o como partículas, siendo esta última la formulación más eficaz para su uso en composiciones inmunogénicas. Una propiedad distintiva de VRP a diferencia de los otros

replicones de AV es su tropismo para células dendríticas (MacDonald, G. H. y col., J Virol 2000, 74: 914-922). Las células dendríticas dirigidas por VRP pueden ser vehículos altamente eficaces para transportar antígeno a ganglios linfáticos y puede ser una estrategia moderadora de dosis eficaz.

Las composiciones inmunogénicas, particularmente los ácidos nucleicos, de la presente invención pueden suministrarse mediante vectores virales, tales como lentivirus, retrovirus, virus del herpes, adenovirus, virus adenoasociados, virus vaccinia, baculovirus, alfavirus y otros virus recombinantes con tropismo celular deseable. Puede usarse una amplia diversidad de alfavirus como vectores virales, incluyendo, por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque de Semliki (ATCC VR 67; ATCC VR 1247), virus del Río Ross (ATCC VR 373; ATCC VR 1246) y virus de encefalitis equina Venezolana (ATCC VR 923; ATCC VR 1250; ATCC VR 1249; ATCC VR 532). Los ejemplos representativos de tales sistemas de vector incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.091.309; 5.217.879; y 5.185.440; y Publicaciones de Patente Internacional N° WO 92/10578; WO 94/21792; WO 95/27069; WO 95/27044; y WO 95/07994. La dirección a región específica de células también se proporciona, por ejemplo, dirigiendo de modo que el polipéptido de fusión se localice en la membrana celular, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.228.621.

Por lo tanto, un gen que codifique una fusión de polipéptidos E7E6 puede introducirse *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro* usando un vector viral o a través de introducción directa de un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN de replicón. La expresión en tejidos diana puede efectuarse dirigiendo el vector recombinante a células específicas, tales como con un vector viral o ligando del receptor, o usando un promotor específico de tejido, o ambos. Se describe el suministro de genes dirigido en la Publicación de Patente Internacional WO 95/28494.

Son vectores virales habitualmente usados para procedimientos de dirección y terapia *in vivo* o *ex vivo* los vectores basados en ADN y vectores retrovirales. Se conocen en la técnica procedimientos para construir y usar vectores virales (véase, por ejemplo Miller y Rosman, BioTechniques 1992, 7: 980-990). Preferentemente, los vectores virales son defectuosos en replicación, es decir, son incapaces de replicar de forma autónoma en la célula diana. En general, los genomas de los vectores virales defectuosos en replicación que se usan dentro del alcance de la presente invención carecen de al menos una región que es necesaria para la replicación del virus en la célula infectada. Estas regiones pueden eliminarse (completas o en parte), o hacerse no funcionales por cualquier técnica conocida por un experto en la materia. Estas técnicas incluyen la delección total, sustitución (por otras secuencias, en particular por el ácido nucleico insertado), delección parcial o adición de una o más bases a una región esencial (para replicación) (para provocar un desplazamiento de fase). Tales técnicas pueden realizarse *in vitro* (en el ADN aislado) o *in situ*, usando las técnicas de manipulación genética o mediante tratamiento con agentes mutagénicos. Preferentemente, el virus defectuoso en replicación conserva las secuencias de su genoma que son necesarias para encapsulación de las partículas virales.

Los vectores virales incluyen un virus de ADN o ARN atenuado o defectuoso, tal como, pero sin limitación, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein Barr (VEB), adenovirus, virus adenoasociado (VAA), VEE y similares. Se prefieren virus defectuosos, que carezcan completamente o casi completamente de genes virales. Los virus defectuosos no generan descendencia después de su introducción en la célula. El uso de vectores virales defectuosos permite la administración de células en un área específica, localizada, sin peligro de que el vector viral prolifere e infecte otras células. Por lo tanto, puede dirigirse específicamente a un tejido particular. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, pero sin limitación, el sistema de VEE defectuoso en replicación como se describe por Pushko y col. (Virology 1997, 239: 389-401), y un vector de adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col. (J. Clin. Invest. 1992, 90: 626-630; véase también La Salle y col., Science 1993, 259: 988-990), y un vector de virus adenoasociado defectuoso (Samulski y col., J. Virol. 1987, 61: 3096-3101; Samulski y col., J. Virol. 1989, 63: 3822-3828; Lebkowski y col., Mol. Cell. Biol. 1988, 8: 3988-3996).

Diversas compañías producen vectores virales de forma comercial, incluyendo pero sin limitación en absoluto Avigen, Inc. (Alameda, CA; vectores AAV), Cell Genesys (Foster City, CA; vectores retrovirales, adenovirales, AAV y vectores lentivirales), Clontech (vectores retrovirales y baculovirales), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; vectores adenovirales y AAV), Genvec (vectores adenovirales), IntroGene (Leiden, Países Bajos; vectores adenovirales), Molecular Medicine (vectores retrovirales, adenovirales y AAV), Norgen (vectores adenovirales), Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; vectores lentivirales), Transgene (Estrasburgo, Francia; vectores adenovirales, retrovirales, lentivirales y de vaccinia), AlphaVax (vectores alfavirales tales como vectores VEE) e Invitrogen (Carlsbad, California).

En otra realización, el vector puede introducirse *in vivo* por lipofección, como ADN desnudo, o con otros agentes facilitadores de transfección (péptidos, polímeros, bupivacaína, etc.). Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, 84: 7413-7417; Felgner y Ringold, Science 1989, 337: 387-388; Mackey y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988, 85: 8027-8031; Ulmer y col., Science 1993, 259: 1754-1748). Se describen compuestos lipídicos útiles y composiciones para transferencia de ácidos nucleicos en las Publicaciones de Patente Internacionales WO 95/18863 y WO 96/17823, y en la Patente de Estados Unidos N° 5.459.127. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con el fin de dirigir (véase, Mackey y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988, 85: 8027-8031). Los péptidos diana, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos o moléculas no peptídicas podrían acoplarse a liposomas químicamente. Otras moléculas también son

útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, Publicación de Patente Internacional WO 95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión de ADN (por ejemplo, Publicación de Patente Internacional WO 96/25508) o un polímero catiónico (por ejemplo, Publicación de Patente Internacional WO 95/21931).

5 También es posible introducir el vector *in vivo* como un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudo para terapia génica pueden introducirse en las células huésped deseadas por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, uso de una pistola génica (por ejemplo, el sistema de pistola génica Helios (Bio-Rad; Hércules, CA) puede usarse para suministro génico epidérmico), o uso de un transportador de vector de ADN (véase, por ejemplo, Wu y col., J. Biol. Chem. 1992, 267: 963-967; Wu y Wu, J. Biol. Chem. 1988, 263: 14621-14624; Hartmut y col., Solicitud de Patente Canadiense N° 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990; Williams y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991, 88: 2726-2730). También pueden usarse enfoques de suministro de ADN mediados por receptor (Curiel y col., Hum. Gene Ther. 1992, 3: 147-154; Wu y Wu, J. Biol. Chem. 1987, 262: 4429-4432). Las Patentes de Estados Unidos N° 5.580.859 y 5.589.466 desvelan el suministro de secuencias de ADN exógeno, sin agentes facilitadores de la transfección, en un mamífero. Como alternativa, el ADN se formula en composiciones con agentes facilitadores de la transfección, que facilitan la inmunización, tales como bupivacaína y otros anestésicos locales (Patente de Estados Unidos N° 6.127.170). Recientemente, se ha descrito una técnica de transferencia de ADN *in vivo* de alta eficacia a tensión relativamente baja, denominada electrotransferencia (Mir y col., C.P. Acad. Sci. 1998, 321: 893; documentos WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175).

20 La expresión "composición inmunogénica", como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier composición que pueda administrarse para inducir una respuesta inmune en el receptor. Una composición inmunogénica generalmente comprende una dosis inmunológicamente eficaz de un inmunógeno (por ejemplo, un antígeno de un agente infeccioso) y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser agua estéril o solución salina isotónica estéril, así como todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con administración a seres humanos. El vehículo apropiado resultará evidente para los expertos en la materia y dependerá en gran parte de la vía de administración.

Puede administrarse una composición inmunogénica a un organismo, por ejemplo, por inhalación o insuflación (a través de la boca o la nariz), o por administración oral, bucal, vaginal, rectal o parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, intraperitoneal o intravenosa y similares). También puede administrarse una composición inmunogénica por transferencia mediada por partículas (por ejemplo, usando una "pistola de partículas"). Véase, por ejemplo, Gainer y col., J. Neurooncol 2000, 47: 23-30; Koide y col., Jpn J. Pharmacol 2000, 83: 167-174; Kuriyama y col., Gene Ther. 2000, 7: 1132-1136; y Yamauchi y col., J. Exp. Zool. 2000, 287: 285-293. Tales procedimientos de transferencia de partículas se prefieren particularmente para composiciones inmunogénicas de vector o ADN, por ejemplo, usando una "pistola génica". La vía de administración apropiada se selecciona dependiendo de la naturaleza de la composición inmunogénica usada, y una evaluación de la edad, peso, sexo y salud general del paciente y los antígenos presentes en la composición inmunogénica, y factores similares por un médico a cargo.

Una composición inmunogénica puede comprender, por ejemplo, una suspensión de un agente infeccioso atenuado o destruido (por ejemplo, un microorganismo tal como una bacteria o un virus, un parásito u otro patógeno, etc.) que provoca una enfermedad infecciosa. Como alternativa, una composición inmunogénica de la invención puede ser una composición inmunogénica polipeptídica o una composición inmunogénica de ADN. La expresión "composición inmunogénica polipeptídica" se refiere a una composición inmunogénica que comprende un polipéptido inmunogénico, por ejemplo un polipéptido derivado de un agente infeccioso que puede ser un antígeno, y por lo tanto activa una respuesta inmune en un organismo. La expresión "composición inmunogénica de ADN" se usa en el presente documento para referirse a composiciones inmunogénicas suministradas por medio de un vector recombinante. Una expresión alternativa usada en el presente documento es "composición inmunogénica de vector" (puesto que algunos vectores potenciales, por ejemplo alfavirus, son virus de ARN y puesto que en algunos casos puede suministrarse ARN no viral en lugar de ADN a las células).

50 La expresión "dosis inmunológicamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto o composiciones que es suficiente para dar como resultado una actividad deseada. Por lo tanto, como se usa para describir una composición inmunogénica, una dosis inmunológicamente eficaz se refiere a la cantidad de un compuesto o composiciones (por ejemplo, un antígeno) que es suficiente para producir una respuesta inmune eficaz. En general, la selección de la cantidad o dosificación inmunológicamente eficaz apropiada para las composiciones inmunogénicas de la presente invención también se basará en la composición inmunogénica particular empleada, así como la condición física del sujeto, más especialmente incluyendo la salud general y peso del sujeto inmunizado. Dicha selección y ajuste hacia arriba o hacia abajo de la dosis eficaz está dentro de la experiencia de la técnica. La cantidad de componente activo requerida para inducir una respuesta inmune sin efectos secundarios significativos varía dependiendo de la composición empleada.

60 Para virus recombinantes, preferentemente defectuosos en replicación, que contengan el ADN que codifica los polipéptidos de fusión E6/E7 mutantes de la presente invención, la cantidad inmunológicamente eficaz es una

cantidad de virus recombinante que es eficaz en una vía de administración para transfectar las células deseadas del sujeto y proporcionar suficientes niveles de expresión del gen seleccionado para proporcionar el efecto deseado. Los niveles de inmunidad pueden supervisarse para determinar la necesidad, si la hubiera, de refuerzos.

El término “adyuvante” se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmune a un antígeno. Un adyuvante puede actuar, por ejemplo, como un depósito tisular que libera lentamente el antígeno, y también como un activador del sistema linfóide que potencia la respuesta inmune (véase, Hood y col., Immunology, Segunda Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, pág. 384). Tales adyuvantes también incluyen, entre otros, MPL™ (monofosforil lípido 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes los compuestos de aminoalquil glucosamino fosfato (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.113.918. Un AGP tal es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable.

Otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Amphigen, Avridine, L121/escualeno, D-lactida-polilactida/glicósido, dipéptido de muramilo, *Bordetella* destruida, saponinas, tales como Quil A o Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540, y partículas generadas de los mismos tales como ISCOMS (complejos inmunoestimuladores), *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (Patente de Estados Unidos N° 6.207.646, toxina del cólera (en una forma de tipo silvestre o mutante, por ejemplo, en la que el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 se reemplaza por otro aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la Publicación de Patente Internacional N° WO 00/18434), una toxina pertussis (PT) o una toxina lábil por calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente Internacional N° WO 93/13302 y WO 92/19265. Diversas citocinas y linfocinas son adecuadas para su uso como adyuvantes. Un adyuvante tal es el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que tiene una secuencia de nucleótidos como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.078.996. Un plásmido que contiene ADNc de GM-CSF se ha transformado en *E. coli* y se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el Número de Acceso 39900. La citocina Interleucina-12 (IL-12) es otro adyuvante que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.723.127. Se ha mostrado que otras citocinas o linfocinas tienen actividad inmunomoduladora, incluyendo, pero sin limitación, las interleucinas 1-alfa, 1-beta, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 18, 15, 16, 17 y 18, los interferones alfa, beta y gamma, factor estimulante de colonias de granulocitos y los factores de necrosis tumoral alfa y beta, y son adecuadas para su uso como adyuvantes.

Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación: sustancias tensioactivas (por ejemplo, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de aminoácidos de octadecilo, lisolecitina, bromuro de dimetil-dioctadecilamonio), metoxihexadecilglicerol y polioles de pluronic; poliaminas, por ejemplo, pirano, dextransulfato, poli IC, carbopol; péptidos, por ejemplo, dipéptido de muramilo, dimetilglicina, tuftsina; emulsiones de aceite; y geles minerales, por ejemplo, fosfato de aluminio, etc., y complejos inmunoestimulantes. El inmunógeno también puede incorporarse en liposomas, o conjugarse con polisacáridos, lipopolisacáridos y/u otros polímeros para su uso en una composición inmunogénica.

Adyuvantes a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, adyuvante incompleto de Freund, sustancias tensioactivas, (por ejemplo, lisolecitina), polioles de pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos. Los adyuvantes ejemplares también incluyen adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Además, pueden proporcionarse proteínas inmunoestimuladoras, tales como quimiocinas, o secuencias de ácidos nucleicos que codifican quimiocinas, como un adyuvante para aumentar la respuesta inmune a una composición inmunogénica.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción alérgica o desafortunada similar (por ejemplo, trastorno gástrico, mareo y similares) cuando se administran a un individuo. Preferentemente, y particularmente cuando se usa una composición inmunogénica en seres humanos, la expresión “farmacéuticamente aceptable” puede significar aprobado por una agencia reguladora (por ejemplo, la Agencia de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos) o enumerada en una farmacopea reconocida en general para su uso en animales (por ejemplo, la Farmacopea de Estados Unidos).

El término “transportador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto. Se emplean preferentemente agua estéril o soluciones salinas acuosas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como transportadores, particularmente para soluciones inyectables. Se describen transportadores farmacéuticos ejemplares adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por F.W. Martin.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, en ensayos de cultivo celular o usando animales experimentales para determinar la

- DL50 y la DE50. Los parámetros de DL50 y DE50 se conocen bien en la técnica, y se refieren a las dosis de un compuesto que son letales para el 50 % de una población y terapéuticamente eficaces en el 50 % de una población, respectivamente. La relación de dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos se denomina el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL50/DE50. Se prefieren compuestos que muestren índices terapéuticos grandes, aunque pueden usarse compuestos que muestren efectos secundarios tóxicos. Sin embargo, en tales casos es particularmente preferible usar sistemas de suministro que dirijan específicamente tales compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a otras células, tejidos u órganos y para reducir efectos secundarios.
- Pueden usarse datos obtenidos de ensayo de cultivo celular o estudios animales para formular un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de compuestos usados en procedimientos terapéuticos de la presente invención preferentemente queda dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la concentración de DE50 pero con poca o sin toxicidad (por ejemplo, por debajo de la concentración DL50). La dosificación particular usada en cualquier aplicación puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de factores tales como la forma de dosificación particular empleada, la vía de administración usada, las condiciones del individuo (por ejemplo, paciente), y así sucesivamente.
- Los animales no humanos incluyen, sin limitación, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, hámsteres, cobayas, etc.; animales domésticos tales como perros y gatos; animales de granja tales como ovejas, cabras, cerdos, caballos y vacas; y primates no humanos.
- Una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular y formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluya la CI50. La concentración CI50 de un compuesto es la concentración que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas (por ejemplo, como se determina a partir de los ensayos de cultivo celular). Las dosificaciones apropiadas para su uso en un individuo particular, por ejemplo en pacientes humanos, puede determinarse después de forma más precisa usando dicha información.
- El término “tratar” significa intentar inducir una respuesta antitumoral contra células del tumor, es decir, el cáncer. Una respuesta antitumoral incluye, pero sin limitación, aumento del tiempo de supervivencia, inhibición de metástasis tumoral, inhibición de crecimiento tumoral, regresión tumoral y desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) a células tumorales no modificadas.
- Pueden medirse de forma rutinaria medidas de compuestos en plasma en un individuo tal como un paciente con técnicas tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de gases.
- Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables.
- Por lo tanto, los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración por las vías descritas anteriormente.
- Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato cálcico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden revertirse por procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones o pueden presentarse como producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes saporíferos, colorantes y edulcorantes según sea apropiado.
- Las preparaciones para administrar oral pueden formularse de forma adecuada para proporcionar liberación controlada del compuesto activo. Para administración bucal las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.
- Para administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección de embolada o infusión continua. Pueden presentarse formulaciones para inyección en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones o en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógenos estéril, antes de su uso.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Tales formulaciones de actuación larga pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el principio activo. El envase puede por ejemplo comprender hoja metálica o plástica, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para administración.

Los términos usados en la presente memoria descriptiva generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se analizan en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al facultativo en la descripción de las composiciones y procedimientos de la invención y cómo prepararlas y usarlas.

EJEMPLOS

La presente invención se describe mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. DISEÑO Y GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE VPH16.

Materiales y procedimientos

Generación de construcciones de replicón de VEE. Los genes E6 y E7 de VPH16 se obtuvieron de pHPV-16 (ATCC N° 45113) por procedimientos de PCR (Horton y col., Gene 1989, 77: 61-8), y se fusionaron en dos orientaciones diferentes para generar fases abiertas de lectura (ORF) de 744 pares de bases (pb) que codifican 248 aminoácidos para todas las construcciones. El codón de inicio de metionina de cada ORF cadena abajo se retiró para eliminar cualquier posibilidad de inicio interno. Se mutaron nucleótidos específicos de las ORF fusionadas usando el Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChang® (Stratagene, La Jolla, CA). Los genes fusionados de tipo silvestre (wt) y mutados (mut) se subclonaron en el vector pVR200 (Alpha Vax; Durham, NC), un plásmido derivado del ADNc de un mutante no neurotrófico altamente atenuado (V3014) de la cepa Trinidad Donkey de encefalitis equina venezolana (VEE) (Grieder, F.B. y col., Virology 1995, 206: 994-1006). El plásmido pVR200 se describe en Pushko y col., (Virology 1997, 239: 389-401, en particular véase pág. 390-391 "Cell lines and plasmids" y pág. 393 Figura 1b). Brevemente, este plásmido tiene el promotor T7 seguido de genes no estructurales de VEE, el promotor subgenómico 26S, el sitio de clonación para el gen o los genes de interés (en la presente invención, las fusiones E6/E7), y un sitio de linealización *NotI*.

Se prepararon partículas de replicón de VEE incompetentes para replicación (VRP) por el procedimiento de auxiliar dividido y se valoraron como se describe (Pushko y col., Virology 1997, 239: 389-401). Brevemente, el plásmido pVR200 (con las fusiones de interés clonadas en él) se cotransfectó en células junto con: (1) una construcción auxiliar codificante de cápsida y (2) una construcción auxiliar codificante de glicoproteína. Ninguna de estas construcciones auxiliares tuvo secuencias de empaquetamiento y por lo tanto no se incorporaron en VRP. De este modo, las VRP resultantes fueron defectuosas para replicación. La potencia de cada preparación de VRP, expresada como unidades infecciosas/mililitro (UI/ml), se definió por el número de partículas positivas E7 como se determinó por titulación en células de riñón de cría de hámster (BHK)-21. Las titulaciones de todas las preparaciones de VRP excedieron 10^9 UI por electroporación; se usó una dosis eficaz de 3×10^5 UI por inmunización a lo largo de estos estudios y como se ha descrito previamente (Velders M.P. y col., Cancer Res 2001, 61: 7861-7867).

Transferencias de Western e inmunofluorescencia. Se infectaron células BHK-21 con las VRP indicadas. Veinticuatro horas después de la infección las células se recogieron en tampón de muestra de SDS para análisis de transferencia de Western o se fijaron con metanolacetona para inmunofluorescencia. Para detectar la expresión de proteínas por transferencia de Western, las proteínas en el lisado celular se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de Polivinilideno (PVD) y se analizaron con el sistema de detección Western Breeze

(Invitrogen; Carlsbad, CA) usando un anticuerpo monoclonal anti-E7 de VPH16 (Zyomed; San Francisco, CA). Para análisis de inmunofluorescencia, las células fijadas se incubaron con un anticuerpo anti-E7 primario seguido de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con FITC (nº 554001, Pharmingen; San Diego, CA). Los núcleos de las células se tiñeron usando Viaprobe (nº 555815, Pharmingen).

5 **Resultados**

Para diseñar composiciones inmunogénicas eficaces y seguras contra cáncer cervical inducido por VPH16, se aumentó la diversidad antigénica expresando los antígenos específicos de tumor tanto E6 como E7. La inclusión de genes E6 y E7 de longitud completa en una composición inmunogénica de VRP es deseable para maximizar la probabilidad de expresar todos los epítomos posibles para estimular linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ en poblaciones humanas diversas de HLA de Clase I y Clase II. Se consiguieron fusiones de las ORF de E6 y E7 en dos orientaciones diferentes por PCR y se mutaron hasta cinco aminoácidos (Figuras 1A y B) para obtener construcciones de expresión para producir polipéptidos de fusión de E6/E7 particulares.

Se ha mostrado que una sustitución de aminoácido sencillo en la posición ⁶³C destruye varias funciones de E6 de VPH16: degradación de p53, degradación de E6TP-1, activación de telomerasa y, en consecuencia, immortalización de células epiteliales primarias (Gao, Q. y col., J Virol 2001, 75: 4459-4466). E6 de VPH16 que contiene una mutación puntual sencilla en ¹⁰⁶C no une ni facilita la degradación de p53 y es incapaz de immortalizar MEC humanas, un fenotipo dependiente de degradación de p53 (Dalal y col., J Virol 1996, 70: 683-688). La proteína E7 de VPH16 de 98 aminoácidos se une a Rb a través de un motivo L-X-C-X-E; mutaciones en las posiciones ²⁴C y ²⁶E de este motivo destruyen unión con Rb y degradación (Munger, K, y col., Oncogene 2001, 20: 7888-7898). Además, de estas dos mutaciones puntuales en E7, se mutó un tercer aminoácido, ⁹¹C, para destruir el dedo de cinc sencillo en E7.

Una primera proteína de fusión, denominada en el presente documento E6E7wt comprende la secuencia de aminoácidos de una secuencia de polipéptido E6 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 13) en el extremo amino terminal y la secuencia de aminoácidos de una secuencia de polipéptido E7 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 14) en el extremo carboxilo terminal. Una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido de fusión tal se proporciona en la SEC ID Nº: 1. Se expone una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica un polipéptido de fusión E6E7 de tipo silvestre tal en la SEC ID Nº: 2.

También se preparó un segundo polipéptido de fusión, denominado E6E7TetM. Como el polipéptido de fusión E6E7wt, E6E7TetM comprenden una secuencia de polipéptido E6 en el extremo amino terminal y una secuencia de polipéptido E7 en el extremo carboxilo terminal. Sin embargo, la secuencia del polipéptido E6 de esta construcción contiene aminoácidos glicina en los restos 63 y 106 del polipéptido E6 en lugar de los aminoácidos cisteína hallados en la secuencia de aminoácidos de E6 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 13). Además, la secuencia de polipéptido E7 de esta construcción contiene aminoácidos glicina en los restos 24 y 26 del polipéptido E7 en lugar de los aminoácidos cisteína (24) y glutamato (26) hallados en la secuencia de aminoácidos de E7 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 14). Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa para un polipéptido de fusión tal en la SEC ID Nº: 3. Se expone una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica un polipéptido de fusión E6E7TetM tal en la SEC ID Nº: 4.

También se preparó un tercer polipéptido de fusión, denominado E6E7PentM. Como el polipéptido de fusión E6E7TetM, E6E7PentM comprende una secuencia de polipéptido E6, que comprende aminoácidos glicina en los restos 63 y 106, en su extremo amino terminal y una secuencia de polipéptido E7 que comprende aminoácidos glicina en los restos 24 y 26, en su extremo carboxilo terminal. Sin embargo, la secuencia de polipéptido E7 de esta proteína de fusión también contiene un aminoácido glicina en el resto 91 de la secuencia de polipéptido E7 en lugar del aminoácido cisteína hallado en la secuencia de aminoácidos E7 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 14). Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa para un polipéptido de fusión tal en la SEC ID Nº: 5. Se expone una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica un polipéptido de fusión E6E7PentM tal en la SEC ID Nº: 6.

Un cuarto polipéptido de fusión, denominado E7E6wt, comprende la secuencia de aminoácidos de una secuencia de polipéptido E7 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 14) en el extremo amino terminal y la secuencia de aminoácidos de una secuencia de polipéptido E6 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 13) en el extremo carboxilo terminal. Una secuencia de aminoácidos representativa para un polipéptido de fusión tal se proporciona en la SEC ID Nº: 7. Se expone una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica un polipéptido de fusión E7E6wt tal en la SEC ID Nº: 8.

También se preparó un quinto polipéptido de fusión, denominado E7E6TetM. Como el polipéptido de fusión E7E6wt, E7E6TetM comprende una secuencia de polipéptido E7 en el extremo amino terminal y una secuencia de polipéptido E6 en el extremo carboxilo terminal. Sin embargo, el polipéptido E7 de esta construcción contiene un resto de glicina en los aminoácidos 24 y 26 del polipéptido E7, en lugar de los aminoácidos cisteína (24) y glutamato (26) hallados en la secuencia de aminoácidos E7 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 14). Además, el polipéptido E6 de esta construcción contiene un resto de glicina en los aminoácidos 63 y 106 del polipéptido E6, en lugar del aminoácido cisteína hallado en la secuencia de aminoácidos E6 de tipo silvestre (SEC ID Nº: 13). Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido de fusión tal en la SEC ID Nº: 9. Se expone una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica un polipéptido de fusión E7E6TetM tal en la SEC ID Nº: 10.

También se preparó un sexto polipéptido de fusión, denominado E7E6PentM. Como E7E6TetM, E7E6PentM comprende un polipéptido E7 que comprende aminoácidos glicina en los restos 24 y 26 del polipéptido E7, en su extremo amino terminal y un polipéptido E6, que comprende aminoácidos glicina en los restos 63 y 106 del polipéptido E6, en su extremo carboxilo terminal. Sin embargo, la secuencia de polipéptido E7 de esta construcción también contiene un aminoácido glicina en el resto 91 del polipéptido E7, en lugar del aminoácido cisteína hallado en la secuencia de aminoácidos E7 de tipo silvestre (SEC ID N°: 14). Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa para una fusión tal en la SEC ID N°: 11. Se expone una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica un polipéptido de fusión E7E6TetM tal en la SEC ID N°: 12.

Las mutaciones en E6 y E7 se diseñaron para 1) interrumpir tres dedos de cinc, desestabilizando de este modo la proteína y acelerando la degradación (y de este modo aumentar la inmunogenicidad) (^{63}C y ^{106}C de E6; ^{91}C de E7 (Dalal y col., J Virol 1996, 70: 683-8; Shi y col., J Virol 1999, 73: 7877-81)); 2) perturbar la degradación inducida por E6 de p53 (^{106}C ; (Dalal y col., J Virol 1996, 70: 683-8)) y unión de E6-TP1 (Gao y col., J Virol 2001, 75: 4459-66); y 3) interrumpir la unión de Rb y degradación por E7 (^{24}C y ^{26}E ; (Edmonds y Vousden, J Virol 1989, 63: 2650-6)). Estas mutaciones se seleccionaron cuidadosamente para quedar fuera de epítomos de HLA conocidos, con la excepción de ^{91}C . Aunque se sabe que ^{91}C es parte de un epítipo de HLA A2 que abarca los aminoácidos 86-93 de E7 (Ressing y col., J Immunol 1995, 154: 5934-43; Ressing y col., Cancer Res 1996, 56: 582-8; Evans y col., Cancer Res 1997, 57: 2943-50), se decidió mutar este aminoácido para conseguir seguridad de composición inmunogénica máxima, puesto que esta mutación rompe un dedo de cinc de E7 que se sabe que se requiere para su actividad inmortalizadora (Jewers y col., J. Virol 1992, 66: 1329-1335). Puesto que esta mutación no se localiza en la región de anclaje del aminoácido P2 de péptidos con propiedades de unión de HLA-A*0201 conocidas (Rammensee y col., Annu Rev Immunol 1993, 11: 213-44), es posible que los polipéptidos mutados C91G puedan conservar su capacidad para unir la molécula de HLA-A*0201. Además, es posible que la mutación C91 pudiera afectar a la escisión de otro epítipo de HLA que abarca los aminoácidos 82-90 de E7. Las construcciones de fusión que contienen esas cinco mutaciones de aminoácidos se nombraron PentM.

Aunque se han desvelado previamente de forma individual mutaciones en cada uno de estos sitios de E6 y E7 de VPH16, no se supo qué combinaciones de estas mutaciones, si las hubiera, mantendrían su inmunogenicidad.

Para desarrollar una composición inmunogénica de cáncer cervical terapéutico que induzca una respuesta mediada por células robusta contra los productos de encogen viral E6 y E7, estas fusiones se clonaron en el sistema basado en replicón de virus de encefalitis equina venezolana (VEE). Las ventajas de composiciones inmunogénicas de VEE recombinantes incluyen altos niveles de expresión de genes heterólogos, tropismo de células dendríticas (dirigiendo de este modo la expresión a tejidos linfoides, un sitio importante para inducir inmunidad), inducción de apoptosis y respuestas inmunes humorales y celulares robustas e inmunización repetida eficaz, puesto que no hay inmunidad existente generalizada a VEE en seres humanos. Además, alfavirus tales como VEE replican el ARN de interés en el citosol celular y son citopáticos, reduciendo de este modo significativamente el riesgo de integración de E6 y E7 en el genoma celular.

Para evaluar la expresión de estas construcciones fusionadas, se infectaron células BHK con las VRP recombinantes y se analizaron posteriormente por transferencia de Western e inmunofluorescencia. El análisis de transferencia de Western reveló que las proteínas de fusión E6E7 migraron generalmente a un peso molecular de aproximadamente 30 kDa en SDS-PAGE. Aunque el nivel de expresión de las construcciones de tipo silvestre y mutadas era comparable, su localización intracelular fue drásticamente diferente. La tinción con inmunofluorescencia de estas proteínas de fusión reveló un patrón de tinción puntuado solapante con los núcleos de VRP tanto E6 como E7 de tipo silvestre, mientras que se observó una tinción perinuclear más difusa para todas las VRP TetM y PentM (datos no mostrados). Una localización perinuclear difusa tal sugiere plegamiento erróneo/agregación de proteínas. Dicho plegamiento erróneo sugiere inestabilidad proteica, apoyando adicionalmente que estas fusiones tengan una capacidad aumentada de inducir respuestas de CTL.

Ejemplo 2: RESPUESTAS INMUNES CELULARES INDUCIDAS POR DIFERENTES CONSTRUCCIONES DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

Materiales y procedimientos

Ratones y líneas celulares. Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra de 6-12 semanas de edad sin patógenos específicos de Taconic Farms (Germantown, NY). Los ratones se albergaron en las instalaciones animales de Wyeth y la Universidad de Loyola (Chicago) en condiciones de filtro superior, con agua y alimento a voluntad. Se obtuvieron ratones HLA-A*0201 hembra de 6-12 semanas de edad sin patógenos específicos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Se usaron células MC57G y EL4 para ensayos de citotoxicidad. Se usaron células BHK-21 para expresión de ARN de VEE, empaquetamiento de partículas de replicón VEE (VRP) y valoración (ensayos de potencia). Se analizaron estudios de exposición a tumores usando las líneas de tumores positivos para E6E7 C3 (Feltkamp, M.C.W. y col., Eur J Immun 1993, 23: 2242-2249), TC-1 (Lin, K.Y., y col., Cancer Res 1996, 56: 21-26) y HLF16. Todas las líneas celulares (excepto células HLF16, C3 y TC-1) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA).

Ensayo de citotoxicidad (CTL). Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 3×10^5 unidades

infecciosas de VRP. Se realizaron ensayos de citotoxicidad 4 semanas después de inmunizar los ratones con una dosis sencilla de 3×10^5 de las VRP indicadas administradas en las almohadillas plantares posteriores. Se volvieron a estimular suspensiones de esplenocitos de células sencillas (20:1) con células MC57G tratadas con mitomicina-C infectadas con vectores de Virus Vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante que codifican E7 o E6 (E7-MVA o E6-MVA) a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. La actividad de CTL se midió 5 días después. Las células MC57G infectadas con MVA E7 o E6 y células EL-4 pulsadas con péptido restringido por E7₄₉₋₅₇ H-2D^b de VPH16 (RAHYNIVTF (SEC ID N°: 41, que corresponde a los aminoácidos 49-57 de SEC ID N°: 14); Lin y col., Cancer Res 1996, 56, 21-6) (ATCC) actuaron como dianas. Se infectaron células MC57G durante 1 h con E7-MVA o E6-MVA a una MOI de 5. Se incubaron células EL-4 (1×10^7) con péptido (20 µg/ml) durante 1 h. Se marcaron después células diana 3 h más tarde con Europio (Eu⁺³; Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO) por electroporación. Se incubaron células efectoras y diana a las relaciones indicadas durante 3 h, después de lo cual se recogieron los sobrenadantes y se mezclaron con solución potenciadora (Wallac; Turku, Finlandia). Se cuantificó la liberación de Eu⁺³ por fluorescencia resuelta en el tiempo usando un fluorímetro 1234 Delfia (Wallac). El porcentaje de lisis específica se calculó como (liberación espontánea experimental/liberación espontánea máxima) x 100. El porcentaje de liberaciones espontáneas varió del 5 al 10 %.

Resultados

Para caracterizar respuestas inmunes inducidas por las diferentes construcciones de composiciones inmunogénicas, se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea en las almohadillas plantares posteriores con 3×10^5 unidades infecciosas de las construcciones de VRP wt y PentM. Un mes después de la inmunización, se midió la lisis mediada por CTL por ensayo de liberación de Europio usando dianas MC57G infectadas con MVA que codifica E6 o E7. La Figura 4A revela que CTL de ratones inmunizados con VRP de tipo silvestre o PentM destruyeron dianas que expresaban E7. Se encontraron resultados idénticos con dianas EL-4 pulsadas con péptido E7₄₉₋₅₇ (datos no mostrados). La lisis mediada por CTL también fue evidente contra dianas E6 de ratones inmunizados con todas las formas de VRP, aunque la lisis se redujo sustancialmente en receptores de VRP mutantes (Figura 4B). Estos resultados para lisis específica de E7 y E6 se reprodujeron en dos experimentos adicionales y también se observaron usando ratones inmunizados con VRP TetM (datos no mostrados).

Estos resultados muestran que la inmunización con VRP que codifican proteínas de fusión mutantes y de tipo silvestre generó respuestas CTL similares al epítipo E7₄₉₋₅₇ inmunodominante que es importante en el rechazo de tumores. Aunque las respuestas CTL eran claramente detectable contra dianas E6 de animales inmunizados con genes de tipo silvestre que expresaban VRP, se observaron respuestas de CTL reducidas en ratones que recibieron una forma mutante de E6, lo que sugiere que ⁶³C y/o ¹⁰⁶C es un componente importante de un epítipo restringido por H-2^b.

Ejemplo 3: PROTECCIÓN TUMORAL Y EFICACIA TERAPÉUTICA DE CONSTRUCCIONES DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS EN MODELOS DE TUMOR C3 Y TC1.

Materiales y procedimientos

Experimentos terapéuticos y de protección tumoral. Se anestesiaron grupos de 14 ratones C57BL/6 por inyección intraperitoneal de xilazina 10 mg/kg (Sigma, St. Louis, MO) y ketamina 100 mg/kg (Abbott Laboratories, Chicago, IL) y se inmunizaron por inyección de 3×10^5 VRP en las almohadillas plantares posteriores los días -21 y -7. Los ratones de control negativo recibieron 3×10^5 UI de proteína verde fluorescente (GFP) VRP. Una semana después, se expuso la mitad de los ratones de cada grupo por inyecciones subcutáneas en el flanco a 5×10^5 células C3 (Feltkamp y col., Eur J Immunol 1995, 25: 2638-42) y se expuso la mitad a 5×10^4 células TC-1 (Lin y col., Cancer Res 1996, 56: 21-6). El crecimiento tumoral se supervisó cada tres días. Para experimentos terapéuticos de C3 se expusieron en primer lugar los ratones a 5×10^5 células tumorales C3 en el flanco seguido 7, 14 y 21 días después de la VRP indicada a 3×10^5 dosis por inmunización. Para el experimento terapéutico de fibroblastos de pulmón humano (HLF) se expusieron ratones transgénicos HLA-A*0201 a 2×10^6 células HLF16 por inyección subcutánea en el flanco izquierdo el día 0. Los días 5, 10 y 15 después de la exposición, los ratones se anestesiaron como se ha descrito anteriormente y se inmunizaron por inyección de 2×10^5 VRP en las almohadillas plantares posteriores. El crecimiento se controló cada 5 días.

Véase también: Ratones y líneas celulares (anteriormente).

Resultados

Se compararon las VRP que codificaban proteínas de fusión E7E6 de tipo silvestre y E7E6PentM en comparación con eficacia antitumoral profiláctica *in vivo*. Los ratones en todos los grupos se inmunizaron los días 0 y 21 con 3×10^5 de la VRP indicada y posteriormente se expusieron a células tumorales C3 o TC-1. Todos los ratones que recibieron GFP-VRP como control negativo desarrollaron tumores en un periodo de aproximadamente 7 días después de la exposición al tumor (Figuras 5A y B). Por el contrario, todos los ratones que recibieron E7E6 de tipo silvestre o PentM se protegieron de exposición al tumor independientemente de si recibieron células tumorales C3 (5×10^5) (Figura 5A) o TC-1 (5×10^4) (Figura 5B). Estos datos sugieren que la protección no se limitó a un modelo de exposición a tumor murino específico y que la protección dependía de forma crítica de productos génicos E6 y E7

codificados por VRP.

Como una medida más rigurosa de eficacia antitumoral, en el siguiente experimento se expusieron los ratones a células tumorales C3 antes de inmunización con VRP de E7E6 de tipo silvestre, PentM o TetM los días 7, 14 y 21. La Figura 6 muestra que el 85 %-100 % de los ratones que recibieron cualquiera de las VRP que expresaban proteínas de fusión E6 y E7 mutantes o de tipo silvestre rechazaron los tumores C3 a diferencia del 0 %-12 % de los ratones del control negativo. Como se ha mostrado previamente por Velders y col. (Cancer res 2001, 61: 7861-7) y en la Figura 6, una composición inmunogénica de VRP que expresaba E7 solamente promovió el rechazo en solamente el 65 %-75 % de los ratones.

En conclusión, la inclusión del gen que codifica E6 como un compañero de fusión con eficacia antitumoral terapéutica potenciada de forma reproducible por E7 (85 %-100 %, Figura 6) en comparación con E7 solamente (67 %-75 %, Figura 6) independientemente de si E6 era de tipo silvestre o mutada. Por lo tanto, las mutaciones en E6, cuando se expresaban como una fusión con E7, no daban como resultado un efecto antitumoral reducido en estos modelos tumorales. Sin embargo, los resultados ilustran que las respuestas de CTL óptimas para epítomos que contenían aminoácidos mutantes pueden no inducirse en algunos individuos inmunizados con VRP mutante. En seres humanos esto puede no ser causa de preocupación dada la diversidad de alelos de HLA de Clase I y Clase II en comparación con el número limitado de alelos H-2 expresados por ratones C57BL/6.

Ejemplo 4: EFICACIA TERAPÉUTICA DE CONSTRUCCIONES DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS EN EL MODELO DE TUMOR HLF16

Aunque los resultados de los Ejemplos 2 y 3 muestran resultados alentadores, el reconocimiento por linfocitos T restringidos con H-2b de antígenos de VPH en ratones C57BL/6 proporciona valor predictivo limitado para respuestas antitumorales restringidas por HLA. Por lo tanto, la demostración de que las mismas composiciones inmunogénicas pueden inducir respuestas restringidas por HLA-A*0201 frente a E6 y E7 de VPH16 en ratones transgénicos HLA-A*0201 es particularmente importante (Ressing y col., J Immunol 1995, 154: 5934-5943).

Se ha mostrado que los linfocitos T CD8⁺ de ratones transgénicos HLA-A*0201 reconocen los mismos antígenos restringido por HLA-A*0201 que los reconocidos por CTL humanos restringidos por HLA-A*0201 (Engelhard y col., J Immunol 1991, 146: 1226-1232; Shirai y col., J Immunol 1995, 154: 2733-2742). El uso de ratones transgénicos para HLA por lo tanto supera las limitaciones de rechazo de tumor restringido por H-2. Sin embargo, no ha estado disponible ningún modelo de tumor de VPH para ensayar respuesta antitumoral restringida por HLA-A*0201. En el presente documento, se presenta el primer modelo de tumor de VPH16 para ratones transgénicos HLA-A*0201 (también descrito en Eiben GL y col., Cancer Research, 15 oct. 2002, 62, N° 20). La inmunogenicidad de las fusiones E6/E7 se ensayó en este modelo.

Este modelo de tumor se desarrolló transfectando fibroblastos de ratones C57BL/6 transgénicos HLA-A 0201 con E6 y E7 de VPH16 y Ras V12, generando una línea celular (HLF16) que es tumorigénica en ratones HLA-A 0201. El epítipo de H-2Db dominante se retiró del gen E7 para asegurar que las respuestas antitumorales fueran independientes del epítipo 49-57 y estuvieran probablemente mediadas a través del HLA-A*0201.

El conjunto de construcciones TetM se usó en el modelo de tumor HLF. Estas construcciones contenían solamente cuatro mutaciones: C63G y C106G en E6; C24G y E26G en E7. La mutación C91 G en E7 (presente en las construcciones PentM) se eliminó debido a que se sabía que era parte de epítipo HLA-A*0201 que abarca los aminoácidos 86-93 de E7 (Ressing y col., J Immunol 1995, 154: 5934-43; Ressing y col., Cancer Res 1996, 56: 582-8; Evans y col., Cancer Res 1997, 57: 2943-50). Usando un algoritmo de unión de clase II (www.imtech.res.in/raghava/propred), también se determinó que hay un epítipo predicho promiscuo para varios haplotipos de clase II entre los aminoácidos 87 y 95 de E7. Puesto que se descubrió que las respuestas inmunes mediadas por clase II eran necesarias para la eficacia terapéutica de la composición inmunogénica de VRP en el modelo de tumor C3, la hipótesis fue que la mutación C91G presente en las construcciones de composición inmunogénica PentM podría interrumpir los epítomos de clase II humanos.

Materiales y procedimientos

Construcción y caracterización del modelo de tumor HLF16. La línea celular de tumor HLF16 derivó de tejido cardíaco pulmonar de ratones C57BL/6 transgénicos HLA-A2 Dd. Después de varias semanas en cultivo, se transformaron fibroblastos adherentes con un vector bicistrónico pIRES que contenía E6/E7 y H-ras activada confiriendo a la vez resistencia a geneticina. El único epítipo restringido por H-2b Clase I conocido del producto génico E749-57 de VPH16 (Velders y col. Cancer res 1997, 61: 7861-7867) se retiró para asegurar que el tumor no presentara este epítipo E7 de VPH16 inmunodominante. Se seleccionaron transfectantes en G418 y se expandieron de forma clonal. Se ensayaron después clones individuales con respecto a expresión de HLA-A*0201 por análisis de FACS. Los clones que mostraban la expresión de HLA-A*0201 más alta se ensayaron posteriormente con respecto a su capacidad para formar colonias en agar blando. El clon de fibroblastos cardíacos pulmonares 16 (HLF16) mostró crecimiento independiente de anclaje en agar blando y se seleccionó para estudios adicionales. La expresión de E7 fue evidente en el citoplasma y núcleo de HLF16 después de tinción con inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-E7. Para determinar si la línea HLF16 formaría de hecho tumores en ratones, se

inyectaron a ratones transgénicos HLA-A*0201 diferentes concentraciones de células tumorales y se supervisaron durante 35 días. Todos los ratones desarrollaron tumores pero solamente los que se expusieron a la dosis más alta, 2×10^6 células HLF16, mantuvieron un tumor durante el ciclo temporal. El tumor HLF16 surgió aproximadamente el día 5 y continuó creciendo progresivamente hasta que se hizo de aproximadamente $12 \times 12 \times 12$ mm el día 35 momento en el cual los ratones se sacrificaron. También se describen construcción y características de la línea celular tumoral HLF16 en Eiben GL y col. (Cancer Research, 15 oct. 2002, 62, N° 20).

Ensayo de agar blando. Se determinó la capacidad de crecimiento independiente del anclaje evaluando la eficacia de formación de colonias de células suspendidas en agar blando. Se sembraron células transformadas y de control ($0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ y $0,1 \times 10^6$) en 5 ml de agar de recubrimiento 0,3 % y se añadieron a placas de 10 mm revestidas con 20 ml de agar subyacente 0,6 %. Se permitió que las placas se secaran y se incubaran a 37°C. Las colonias se contaron 3 semanas después de la siembra en placas.

Véase también: Ratones y líneas celulares, experimentos terapéuticos y de protección tumoral y transferencias de Western e inmunofluorescencia (anteriormente).

Resultados

Las construcciones de TetM se comprobaron con respecto a expresión por transferencia de Western e inmunofluorescencia de células infectadas por BHK. Las proteínas TetM tanto E6E7 como E7E6 migraron a aproximadamente 30 kDa en SDS-PAGE y tuvieron una localización perinuclear difusa de forma muy similar a las construcciones PentM.

Se analizaron construcciones de composición inmunogénica tanto PentM como TetM con respecto a su eficacia terapéutica tumoral en el modelo de tumor de HLF (Figura 7). Se expusieron los ratones transgénicos a 2×10^6 células HLF16 por vía subcutánea y los días 5, 10 y 15 después de la exposición, los ratones se inmunizaron con VRP GFP, VRP TetM o VRP PentM. El rechazo de tumor completo siguió a la inmunización con VRP E7E6 TetM, mientras que las VRP E7E6 PentM y VRP E6E7 PentM indujeron regresión tumoral del 90 % de los ratones, excepto E6E7 TetM (Figura 7). Estos resultados demuestran que la inmunización terapéutica con varias de las VRP ensayadas en el presente documento dio como resultado un alto grado de eficacia antitumoral independiente de contribuciones por linfocitos T específicos para E7₄₉₋₅₇. Además, estos resultados demuestran que las fusiones en las que E7 está carboxilo terminal de E7 (fusiones E7E6) proporcionan mayor protección inmune que sus homólogos en los que E6 está en el extremo amino terminal (fusiones E6E7).

A partir de los datos de eficacia terapéutica colectiva (Figuras 6 y 7) entre modelos de tumor C3 y HLF16, los inventores pueden concluir que las VRP que codifican formas mutantes de E6 y E7 de VPH16, sin ninguna proteína auxiliar, citocina o adyuvante, son altamente eficaces en la erradicación de tumores murinos establecidos.

Ejemplo 5: LAS VRP QUE EXPRESAN E6 Y E7 MUTANTE NO INDUCEN DEGRADACIÓN DE P53 Y RB.

Los niveles de estado estacionario de p53 y Rb en MEC humanas primarias se evaluó después de infección con VRP que expresaban E6 y E7 de VPH16 de tipo silvestre, como proteínas de fusión o individuales, proteína de fusión E7E6 TetM o GFP como un control negativo.

Materiales y procedimientos

Detección de p53 y Rb. Se infectaron células epiteliales de mamífero humanas primarias (MEC, Clonetics, San Diego, CA) con VRP que codificaban formas de tipo silvestre o mutantes de E6 y E7 a MOI = 10 y se recogieron proteínas celulares totales 16-20 horas después. Para potenciar la detección de p53, las células se trataron con actinomicina D 1,0 nM (Sigma, St. Louis, MO). Se cargaron veinticinco microgramos de proteína total por carril, se sometieron a electroforesis por SDS-PAGE, y se transfirieron a membranas de PVDF. Las transferencias de Western se exploraron usando anticuerpo anti-p53 (FL-393, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) o anticuerpo anti-Rb (Catálogo n° 554136, BD Phanningen, San Diego, CA). Los niveles de tubulina se supervisaron como controles de carga explorando con un anticuerpo anti-tubulina (H-235, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA).

Resultados

Se determinó si una forma mutante de proteína de fusión de E6 y E7, cuando se expresó en el contexto de infección por VRP, inactivaría funcionalmente p53 y Rb en comparación con versiones de tipo silvestre de estas proteínas. La E7E6 TetM se seleccionó debido a que demostró alta eficacia antitumoral (Figuras 6 y 7) y contenía un número mínimo de mutaciones.

Se infectaron células epiteliales de mamífero humanas primarias (MEC) con VRP que codificaban E6 de VPH16 solamente, E7 solamente, E7E6 de tipo silvestre o E7E6 TetM. Aproximadamente veinte horas después de infección con una MOI = 10 de cada una de estas VRP, los lisados celulares que contenían cantidades equivalentes de proteína celular total se sometieron a electroforesis por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se exploraron con anticuerpos específicos para p53 (Figura 8A), Rb (Figura 8B) y tubulina como un control de carga. Los resultados de estas transferencias de Western se muestran en las Figuras 8A y 8B son representativas de dos

experimentos independientes.

Las MEC infectadas con VRP que codificaban E6 solamente o proteína de fusión E7E6 de tipo silvestre contenían niveles indetectables de p53 a diferencia de MEC infectadas con E7E6 TetM que contenía niveles de p53 comparables a muestras infectadas con GFP-VRP de control negativo (Figura 8A). Las MEC infectadas con VRP que codificaban E7 solamente o proteína de fusión E7E6 de tipo silvestre contenían niveles indetectables de Rb a diferencia de MEC infectada con VRP de E7E6 TetM o GFP-VRP (Figura 8B). La presencia de proteína de fusión que contiene E7 en las muestras infectadas por VRP de E7E6 de tipo silvestre y E7E6 TetM se verificó explorando esos carriles con un anticuerpo monoclonal anti-E7 (Figuras 8A y B). Los resultados muestran que los niveles de p53 y Rb están reducidos en gran medida en MEC primarias que expresan versiones de tipo silvestre de E6 y E7 en el contexto de una infección de VRP pero son normales en MEC que expresan E7E6 TetM después de infección por VRP.

En resumen, la infección por VRP de MEC reveló niveles reducidos en gran medida de p53 y Rb en cultivos que contenían formas de tipo silvestre de E6 y E7, respectivamente; la mera fusión de E7 con E6 no fue suficiente para alterar la actividad de ninguna de las proteínas (Figuras 8A y B). Por el contrario, las MEC infectadas con VRP de E7E6 TetM que contenían mutaciones E6 (^{63}C y ^{106}C) y E7 (^{24}C y ^{26}E) contenían niveles normales de p53 y Rb (Figuras 8A y B), lo que indica que estas cuatro mutaciones extinguieron la actividad oncogénica primaria de estas proteínas. Una evaluación del potencial de inmortalización de VRP de E7E6 TetM reveló que las MEC murieron después de la infección, lo que es una consecuencia esperada de la expresión de las proteínas no estructurales AV expresadas por replicones (Griffith y col., Annu. Rev. Microbiol. 1997, 51: 565-592) y apoya adicionalmente la seguridad de este vector.

Se citan numerosas referencias, incluyendo patentes, solicitudes de patentes y diversas publicaciones y se analizan en la descripción de la presente invención. La cita y/o análisis de tales referencias se proporciona únicamente para clarificar la descripción de la presente invención y no es una admisión de que ninguna referencia tal sea "técnica anterior" para la invención descrita en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wyeth
Cassetti, Maria C.
Smith, Larry

<120> POLIPÉPTIDOS DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

<130> 00630/200M137-WO0

<150> US 60/415.929
<151> 03-10-2002

<160> 65

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 248
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 1

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

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

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
145 150 155 160

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu
165 170 175

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
180 185 190

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
195 200 205

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
210 215 220

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
225 230 235 240

Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
245

<210> 2

<211> 747

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 2

```

atgtttcagg acccacagga gcgacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gaggtatatg actttgcttt tggggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttggt tgatttggtta      300
attaggtgta ttaactgtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cgggtggaccg gtcgatgtat gtcttggtgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaacccag ctgcatggag atacacctac attgcatgaa      480
tatatgttag atttgcaacc agagacaact gatctctact gttatgagca attaaatgac      540
agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc      600
cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa      660
agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg      720
tgccccatct gttctcagaa accataa                                           747

```

5

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

10

<400> 3

```

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

```

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

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Gly Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
145 150 155 160

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly
165 170 175

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
180 185 190

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
195 200 205

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
210 215 220

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
225 230 235 240

Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
245

<210> 4

<211> 747

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 4

```

atgtttcagg acccacagga ggcacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gaggatatac actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtagggtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgtaa      300
attagggtgta ttaacgggtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cgggtggaccg gtcgatgtat gtcttggtgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgcatggag atacacctac attgcatgaa      480
tatatgtag atttgcaacc agagacaact gatctctacg gttatgggca attaaatgac      540
agctcagagg aggaggatga aatagatggg ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc      600
cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa      660
agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg      720
tgccccatct gttctcagaa accataa                                           747

```

<210> 5

<211> 248

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 5

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

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

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Gly Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
145 150 155 160

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly
165 170 175

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
180 185 190

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
195 200 205

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
210 215 220

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
225 230 235 240

Gly Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
245

<210> 6
<211> 747
<212> ADN

ES 2 391 451 T3

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 6

```

atgtttcagg acccacagga ggcacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gaggatatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtaggtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttggtg tgatttgta      300
attaggtgta ttaacgggtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cgggtggaccg gtcgatgtat gtcttggtgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgcatggag atacacctac attgcatgaa      480
tatatgttag atttgcaacc agagacaact gatctctacg gttatgggca attaaatgac      540
agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc      600
cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa      660
agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattggtg      720
ggcccatctt gttctcagaa accataa      747

```

5

<210> 7

<211> 248

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 7

10

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 Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
100 105 110

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
115 120 125

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
130 135 140

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys
145 150 155 160

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
165 170 175

Cys Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro
180 185 190

Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys
195 200 205

Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn
210 215 220

Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
225 230 235 240

Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
245

<210> 8
<211> 747
<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 8

```

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgaacc agagacaact      60
gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt      120
ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag      180
tgtgactcta cgcttcgggt gtgctgacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa      240
gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgcccatctt gttctcagaa accatttcag      300
gacccacagg agcgacccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata      360
catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgcgacg tgaggatatat      420
gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtatgt      480
gataaatggt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg      540
tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccggtgt gtgatttggt aattaggtgt      600
attaactgtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa      660
agattccata atataagggg tcggtggacc ggtcgatgta tgtcttggtg cagatcatca      720
agaacacgta gagaaaccca gctgtaa                                     747

```

5

<210> 9

<211> 248

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 9

```

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 Gly Tyr Gly 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

```

10

Lys Pro Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
100 105 110

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
115 120 125

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
130 135 140

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Gly
145 150 155 160

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
165 170 175

Cys Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro
180 185 190

Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys
195 200 205

Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn
210 215 220

Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
225 230 235 240

Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
245

<210> 10

<211> 747

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 10

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatggttag atttgcaacc agagacaact 60

gatctctacg gttatgggca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120

ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180

tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240

gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accatttcag 300

gaccacagg agcgacccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata 360

catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgagacg tgaggtatat 420

gactttgctt ttccgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtaggt 480

gataaatgtt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg 540

ES 2 391 451 T3

tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttggt aattaggtgt	600
attaacgggtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa	660
agattccata atataagggg tcgggtggacc ggtcgatgta tgtcttggtg cagatcatca	720
agaacacgta gagaaaccca gctgtaa	747

<210> 11
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 16
 <400> 11

5

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 Gly Tyr Gly 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 Gly Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95
 Lys Pro Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
 100 105 110
 Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
 115 120 125
 Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
 130 135 140
 Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Gly
 145 150 155 160
 Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
 165 170 175
 Cys Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro
 180 185 190
 Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys
 195 200 205
 Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn
 210 215 220
 Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
 225 230 235 240
 Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 245

<210> 12

<211> 747

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 12

```

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgcaacc agagacaact    60
gatctctacg gttatgggca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggg    120
ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag    180
tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa    240
gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg ggccccatct gttctcagaa accatttcag    300
gacccacagg agcgacccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata    360
catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgcgacg tgaggtatat    420
gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtaggt    480
gataaatgtt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg    540
tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttgtt aattaggtgt    600
attaacggtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa    660
agattccata atataagggg tcggtggacc ggtcgaatga tgccttggtg cagatcatca    720
agaacacgta gagaaacca gctgtaa                                     747

```

5

<210> 13

<211> 151

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

10

<400> 13

```

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

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

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
 35             40             45

```

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150

<210> 14
<211> 98
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 16
<400> 14

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> 15
<211> 158
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 18

<400> 15

```

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1          5          10          15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys
          20          25          30

Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala
          35          40          45

Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala
          50          55          60

Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His
65          70          75          80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr
          85          90          95

Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
          100          105          110

Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His
          115          120          125

Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg
          130          135          140

Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
145          150          155

```

5

<210> 16

<211> 149

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 31

10

<400> 16

```

Met Phe Lys Asn Pro Ala Glu Arg Pro Arg Lys Leu His Glu Leu Ser
1          5          10          15

Ser Ala Leu Glu Ile Pro Tyr Asp Glu Leu Arg Leu Asn Cys Val Tyr
          20          25          30

Cys Lys Gly Gln Leu Thr Glu Thr Glu Val Leu Asp Phe Ala Phe Thr
          35          40          45

Asp Leu Thr Ile Val Tyr Arg Asp Asp Thr Pro His Gly Val Cys Thr
          50          55          60

```

Lys Cys Leu Arg Phe Tyr Ser Lys Val Ser Glu Phe Arg Trp Tyr Arg
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Lys Gly Ile
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Thr Cys Gln Arg Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Gly Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Ile Ala Cys Trp Arg Arg Pro Arg
130 135 140

Thr Glu Thr Gln Val
145

<210> 17
<211> 149
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 33

<400> 17

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

Gln Ala Leu Glu Thr Thr Ile His Asn Ile Glu Leu Gln Cys Val Glu
20 25 30

Cys Lys Lys Pro Leu Gln Arg Ser Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Ala
35 40 45

Asp Leu Thr Val Val Tyr Arg Glu Gly Asn Pro Phe Gly Ile Cys Lys
50 55 60

Leu Cys Leu Arg Phe Leu Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Asn
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Leu Glu Gln Thr Val Lys Lys Pro Leu
85 90 95

Asn Glu Ile Leu Ile Arg Cys Ile Ile Cys Gln Arg Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Gln Glu Lys Lys Arg His Val Asp Leu Asn Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Ser Gly Arg Trp Ala Gly Arg Cys Ala Ala Cys Trp Arg Ser Arg Arg
130 135 140

Arg Glu Thr Ala Leu
145

<210> 18
<211> 149
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 35

<400> 18

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

Asn Glu Val Glu Glu Ser Ile His Glu Ile Cys Leu Asn Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Glu Leu Gln Arg Ser Glu Val Tyr Asp Phe Ala Cys Tyr
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Glu Gly Gln Pro Tyr Gly Val Cys Met
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg Trp Tyr Arg
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Lys Gln Cys Asn Lys Gln Leu
85 90 95

Cys His Leu Leu Ile Arg Cys Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Val Glu Lys Gln Arg His Leu Glu Glu Lys Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Gly Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Trp Lys Pro Thr Arg
130 135 140

Arg Glu Thr Glu Val
145

<210> 19
<211> 158
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 39

<400> 19

Met Ala Arg Phe His Asn Pro Ala Glu Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Thr Leu Asp Thr Thr Leu Gln Asp Ile Thr Ile Ala Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Arg Arg Pro Leu Gln Gln Thr Glu Val Tyr Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Ser Asp Leu Tyr Val Val Tyr Arg Asp Gly Glu Pro Leu Ala Ala
50 55 60

Cys Gln Ser Cys Ile Lys Phe Tyr Ala Lys Ile Arg Glu Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Ala Thr Thr Leu Glu Asn Ile Thr Asn Thr
85 90 95

Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Met Cys Cys Leu Lys Pro Leu
100 105 110

Cys Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Ser Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Lys Ile Ala Gly Ser Tyr Thr Gly Gln Cys Arg Arg Cys Trp Thr Thr
130 135 140

Lys Arg Glu Asp Arg Arg Leu Thr Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 20
<211> 158
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 45
<400> 20

Met Ala Arg Phe Asp Asp Pro Lys Gln Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Val Ser Ile Ala Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Lys Ala Thr Leu Glu Arg Thr Glu Val Tyr Gln Phe Ala
35 40 45

Phe Lys Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Cys Ile Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Tyr Ser Asn Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Lys Ile Thr Asn Thr
85 90 95

Glu Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu

	100		105		110										
Asn	Pro	Ala	Glu	Lys	Arg	Arg	His	Leu	Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	Phe	His
		115					120					125			
Ser	Ile	Ala	Gly	Gln	Tyr	Arg	Gly	Gln	Cys	Asn	Thr	Cys	Cys	Asp	Gln
	130					135					140				
Ala	Arg	Gln	Glu	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Arg	Glu	Thr	Gln	Val		
145					150					155					

<210> 21
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 51
 <400> 21

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

<210> 22
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 52
 <400> 22

Met Phe Glu Asp Pro Ala Thr Arg Pro Arg Thr Leu His Glu Leu Cys
1 5 10 15

Glu Val Leu Glu Glu Ser Val His Glu Ile Arg Leu Gln Cys Val Gln
20 25 30

Cys Lys Lys Glu Leu Gln Arg Arg Glu Val Tyr Lys Phe Leu Phe Thr
35 40 45

Asp Leu Arg Ile Val Tyr Arg Asp Asn Asn Pro Tyr Gly Val Cys Ile
50 55 60

Met Cys Leu Arg Phe Leu Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Gln
65 70 75 80

Tyr Ser Leu Tyr Gly Lys Thr Leu Glu Glu Arg Val Lys Lys Pro Leu
85 90 95

Ser Glu Ile Thr Ile Arg Cys Ile Ile Cys Gln Thr Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Glu Arg His Val Asn Ala Asn Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Met Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Ser Glu Cys Trp Arg Pro Arg Pro
130 135 140

Val Thr Gln Val
145

<210> 23
<211> 155
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 56

<400> 23

Met Glu Pro Gln Phe Asn Asn Pro Gln Glu Arg Pro Arg Ser Leu His
1 5 10 15

His Leu Ser Glu Val Leu Glu Ile Pro Leu Ile Asp Leu Arg Leu Ser
20 25 30

Cys Val Tyr Cys Lys Lys Glu Leu Thr Arg Ala Glu Val Tyr Asn Phe
35 40 45

Ala Cys Thr Glu Leu Lys Leu Val Tyr Arg Asp Asp Phe Pro Tyr Ala
50 55 60

Val Cys Arg Val Cys Leu Leu Phe Tyr Ser Lys Val Arg Lys Tyr Arg
65 70 75 80

Tyr Tyr Asp Tyr Ser Val Tyr Gly Ala Thr Leu Glu Ser Ile Thr Lys
85 90 95

Lys Gln Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Tyr Arg Cys Gln Ser Pro
100 105 110

Leu Thr Pro Glu Glu Lys Gln Leu His Cys Asp Arg Lys Arg Arg Phe
115 120 125

His Leu Ile Ala His Gly Trp Thr Gly Ser Cys Leu Gly Cys Trp Arg
130 135 140

Gln Thr Ser Arg Glu Pro Arg Glu Ser Thr Val
145 150 155

<210> 24

<211> 149

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 58

<400> 24

ES 2 391 451 T3

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

Gln Ala Leu Glu Thr Ser Val His Glu Ile Glu Leu Lys Cys Val Glu
 20 25 30

Cys Lys Lys Thr Leu Gln Arg Ser Glu Val Tyr Asp Phe Val Phe Ala
 35 40 45

Asp Leu Arg Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Phe Ala Val Cys Lys
 50 55 60

Val Cys Leu Arg Leu Leu Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Asn
 65 70 75 80

Tyr Ser Leu Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Gln Thr Leu Lys Lys Cys Leu
 85 90 95

Asn Glu Ile Leu Ile Arg Cys Ile Ile Cys Gln Arg Pro Leu Cys Pro
 100 105 110

Gln Glu Lys Lys Arg His Val Asp Leu Asn Lys Arg Phe His Asn Ile
 115 120 125

Ser Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Ala Val Cys Trp Arg Pro Arg Arg
 130 135 140

Arg Gln Thr Gln Val
 145

<210> 25
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 59
 <400> 25

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Gln Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
 1 5 10 15

Leu Ser Thr Thr Leu Asn Ile Pro Leu His Asp Ile Arg Ile Asn Cys
 20 25 30

Val Phe Cys Lys Gly Glu Leu Gln Glu Arg Glu Val Phe Glu Phe Ala
 35 40 45

Phe Asn Asp Leu Phe Ile Val Tyr Arg Asp Cys Thr Pro Tyr Ala Ala
 50 55 60

Cys Leu Lys Cys Ile Ser Phe Tyr Ala Arg Val Arg Glu Leu Arg Tyr
 65 70 75 80

Tyr Arg Asp Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Ala Glu Thr Lys Thr
 85 90 95

Pro Leu His Glu Leu Leu Ile Arg Cys Tyr Arg Cys Leu Lys Pro Leu
 100 105 110

Cys Pro Thr Asp Lys Leu Lys His Ile Thr Glu Lys Arg Arg Phe His
 115 120 125

Asn Ile Ala Gly Ile Tyr Thr Gly Gln Cys Arg Gly Cys Arg Thr Arg
 130 135 140

Ala Arg His Leu Arg Gln Gln Arg Gln Ala Arg Ser Glu Thr Leu Val
 145 150 155 160

<210> 26
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 68
 <400> 26

Met Ala Leu Phe His Asn Pro Glu Glu Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
 1 5 10 15

Leu Cys Arg Thr Leu Asp Thr Thr Leu His Asp Val Thr Ile Asp Cys
 20 25 30

Val Tyr Cys Arg Arg Gln Leu Gln Arg Thr Glu Val Tyr Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Ser Asp Leu Cys Val Val Tyr Arg Asp Gly Val Pro Phe Ala Ala
50 55 60

Cys Gln Ser Cys Ile Lys Phe Tyr Ala Lys Ile Arg Glu Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Tyr Ser Glu Ser Val Tyr Ala Thr Thr Leu Glu Thr Ile Thr Asn Thr
85 90 95

Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Met Ser Cys Leu Lys Pro Leu
100 105 110

Cys Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Thr Thr Lys Arg Arg Leu His
115 120 125

Lys Ile Ala Gly Asn Phe Thr Gly Gln Cys Arg His Cys Trp Thr Ser
130 135 140

Lys Arg Glu Asp Arg Arg Arg Ile Arg Gln Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 27

<211> 105

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 18

<400> 27

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
20 25 30

Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
35 40 45

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
50 55 60

Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Lys Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
65 70 75 80

Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe
85 90 95

Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
100 105

<210> 28
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 31

<400> 28

```

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

Pro Glu Ala Thr Asp Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Pro Asp Ser Ser
          20              25              30

Asp Glu Glu Asp Val Ile Asp Ser Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
          35              40              45

Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Cys Lys Ser Thr
          50              55              60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr Gln Val Asp Ile Arg Ile Leu Gln
65              70              75              80

Glu Leu Leu Met Gly Ser Phe Gly Ile Val Cys Pro Asn Cys Ser Thr
          85              90              95

Arg Leu
    
```

<210> 29
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 33

<400> 29

```

Met Arg Gly His Lys Pro Thr Leu Lys Glu Tyr Val Leu Asp Leu Tyr
 1              5              10              15

Pro Glu Pro Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
          20              25              30

Asp Glu Asp Glu Gly Leu Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Gln Pro Ala
          35              40              45

Thr Ala Asp Tyr Tyr Ile Val Thr Cys Cys His Thr Cys Asn Thr Thr
          50              55              60

Val Arg Leu Cys Val Asn Ser Thr Ala Ser Asp Leu Arg Thr Ile Gln
65              70              75              80

Gln Leu Leu Met Gly Thr Val Asn Ile Val Cys Pro Thr Cys Ala Gln
          85              90              95

Gln
    
```

<210> 30
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 35

<400> 30

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

Pro Glu Ala Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Cys Asp Ser Ser
 20 25 30

Glu Glu Glu Glu Asp Thr Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Lys Pro
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Ser Cys Cys Lys Cys Glu Ala
 50 55 60

Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Ile Asp Ile Arg Lys Leu
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Phe Gly Ile Val Cys Pro Gly Cys Ser
 85 90 95

Gln Arg Ala

<210> 31
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 39

<400> 31

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

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

Gly Glu Ser Glu Asp Glu Ile Asp Glu Pro Asp His Ala Val Asn His
 35 40 45

Gln His Gln Leu Leu Ala Arg Arg Asp Glu Pro Gln Arg His Thr Ile
 50 55 60

Gln Cys Ser Cys Cys Lys Cys Asn Asn Thr Leu Gln Leu Val Val Glu
 65 70 75 80

Ala Ser Arg Asp Thr Leu Arg Gln Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp Ser
85 90 95

Leu Gly Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Ala Asn Gln
100 105

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 45

<400> 32

Met His Gly Pro Arg Glu Thr Leu Gln Glu Ile Val Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Leu Asp Pro Val Asp Leu Leu Cys Tyr Glu Gln Leu
20 25 30

Ser Glu Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ala Asp Gly Val Ser His Ala
35 40 45

Gln Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Lys Ile Leu Cys
50 55 60

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

Ala Glu Asp Leu Arg Thr Leu Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser
85 90 95

Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Asn Gln
100 105

<210> 33

<211> 101

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 51

<400> 33

Met Arg Gly Asn Val Pro Gln Leu Lys Asp Val Val Leu His Leu Thr
1 5 10 15

Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu Gln Cys Tyr Glu Gln Phe Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Val Asp Asn Met Arg Asp Gln Leu Pro Glu Arg
35 40 45

Arg Ala Gly Gln Ala Thr Cys Tyr Arg Ile Glu Ala Pro Cys Cys Arg
50 55 60

Cys Ser Ser Val Val Gln Leu Ala Val Glu Ser Ser Gly Asp Thr Leu
65 70 75 80

Arg Val Val Gln Gln Met Leu Met Gly Glu Leu Ser Leu Val Cys Pro
85 90 95

Cys Cys Ala Asn Asn
100

<210> 34
<211> 99
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 52
<400> 34

Met Arg Gly Asp Lys Ala Thr Ile Lys Asp Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Gly Asp Ser Ser
20 25 30

Asp Glu Glu Asp Thr Asp Gly Val Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Glu
35 40 45

Gln Ala Thr Ser Asn Tyr Tyr Ile Val Thr Tyr Cys His Ser Cys Asp
50 55 60

Ser Thr Leu Arg Leu Cys Ile His Ser Thr Ala Thr Asp Leu Arg Thr
65 70 75 80

Leu Gln Gln Met Leu Leu Gly Thr Leu Gln Val Val Cys Pro Gly Cys
85 90 95

Ala Arg Leu

<210> 35
<211> 105
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 56
<400> 35

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

Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu Gln Cys Asn Glu Gln Leu Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Val Asp His Leu Gln Glu Arg Pro Gln
35 40 45

Gln Ala Arg Gln Ala Lys Gln His Thr Cys Tyr Leu Ile His Val Pro
50 55 60
Cys Cys Glu Cys Lys Phe Val Val Gln Leu Asp Ile Gln Ser Thr Lys
65 70 75 80
Glu Asp Leu Arg Val Val Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val
85 90 95
Thr Cys Pro Leu Cys Ala Ser Ser Asn
100 105

<210> 36
<211> 98
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 58
<400> 36

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

Gln Gln

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 59
<400> 37

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Cys Asp Ile Val Leu Asp Leu Glu
1 5 10 15
Pro Gln Asn Tyr Glu Glu Val Asp Leu Val Cys Tyr Glu Gln Leu Pro
20 25 30

Asp Ser Asp Ser Glu Asn Glu Lys Asp Glu Pro Asp Gly Val Asn His
35 40 45
Pro Leu Leu Leu Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Asn Ile Val
50 55 60
Cys Val Cys Cys Lys Cys Asn Asn Gln Leu Gln Leu Val Val Glu Thr
65 70 75 80
Ser Gln Asp Gly Leu Arg Ala Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp Thr Leu
85 90 95
Ser Phe Val Cys Pro Leu Cys Ala Ala Asn Gln
100 105

<210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano de tipo 68
<400> 38

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

<210> 39
<211> 152
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(152)
<223> donde Xaa es cualquier aminoácido
<400> 39

Xaa Xaa Xaa Phe Glx Asp Pro Xaa Glu Arg Pro Xaa Lys Leu Xaa Asp
 1 5 10 15

Leu Cys Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa His Asx Ile Xaa Xaa Xaa Cys
 20 25 30

Val Tyr Cys Lys Xaa Glx Leu Glx Arg Xaa Glu Val Tyr Xaa Phe Ala
 35 40 45

Phe Xaa Asp Leu Xaa Ile Val Tyr Arg Asp Xaa Xaa Pro Xaa Ala Xaa
 50 55 60

Cys Xaa Xaa Cys Leu Xaa Phe Tyr Ser Lys Ile Xaa Glu Xaa Arg Xaa
 65 70 75 80

Tyr Xaa Xaa Ser Val Tyr Gly Xaa Thr Leu Glu Xaa Xaa Thr Xaa Lys
 85 90 95

Xaa Leu Xaa Asx Leu Leu Ile Arg Cys Xaa Xaa Cys Gln Xaa Pro Leu
 100 105 110

Cys Pro Xaa Glu Lys Xaa Arg His Xaa Asx Xaa Lys Xaa Arg Phe His
 115 120 125

Asn Ile Xaa Gly Xaa Trp Thr Gly Xaa Cys Xaa Xaa Cys Trp Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150

<210> 40
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(104)
 <223> donde Xaa es cualquier aminoácido

<400> 40

Met Xaa Gly Xaa Xaa Pro Thr Leu Xaa Xaa Xaa Val Leu Asp Leu Xaa
 1 5 10 15

Pro Glx Xaa Xaa Xaa Asp Leu Xaa Cys Tyr Glu Gln Leu Xaa Asp Ser
 20 25 30

Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100

35

40

45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Cys
50 55 60

Cys Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Val Glx Ser Xaa Xaa Xaa
65 70 75 80

Asp Leu Arg Xaa Leu Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Leu Xaa Xaa Val
85 90 95

Cys Pro Xaa Cys Ala Xaa Xaa Xaa
100

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano de tipo 16

<400> 41

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

<210> 42

<211> 477

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 18

<400> 42

atggcgcgct ttgaggatcc aacacggcga ccctacaagc tacctgatct gtgcacggaa 60
ctgaacactt cactgcaaga catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa 120
cttacagagg tatttgaatt tgcattttaa gatttatttg tgggtgtatag agacagtata 180
ccccatgctg catgccataa atgtatagat ttttattcta gaattagaga attaagacat 240
tattcagact ctgtgtatgg agacacattg gaaaaactaa ctaacactgg gttatacaat 300
ttattaataa ggtgcctgcg gtgccagaaa ccgttgaatc cagcagaaaa acttagacac 360
cttaatgaaa aacgacgatt tcacaacata gctgggcact atagaggcca gtgccattcg 420
tgctgcaacc gagcacgaca ggaacgactc caacgacgca gagaaacaca agtataa 477

<210> 43

<211> 474

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 31

<400> 43

atgttcaaaa atcctgcaga aagacctcgg aaattgcatg aactaagctc ggcattggaa 60
 ataccctacg atgaactaag attgaattgt gtctactgca aaggtcagtt aacagaaaca 120
 gaggtattag attttgcatt tacagattta acaatagtat ataggacga cacaccacac 180
 ggagtgtgta caaaatgttt aagattttat tcaaaagtaa gtgaatttag atggtataga 240
 tatagtgtgt atggaacaac attagaaaaa ttgacaaaca aaggatatatg tgatttgtta 300
 attaggtgta taactgtgtca aagaccgttg tgtccagaag aaaaacaaag acatttggat 360
 aaaaagaaac gattccaca cataggagga aggtggacag gacgttgcac agcatgttgg 420
 agaagacctc gtactgaaac ccaagtgtaa acatgcgtgg agaaacacct acgt 474

<210> 44
 <211> 450
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 33

<400> 44

atgtttcaag acactgagga aaaaccacga acattgcatg atttgtgcca agcattggag 60
 acaactatac acaacattga actacagtgc gtggaatgca aaaaaccttt gcaacgatct 120
 gaggtatatg attttgcatt tgcagattta acagtgtat atagagaggg aaatccattt 180
 ggaatatgta aactgtgttt gcggttctta tctaaaatta gtgaatatag acattataat 240
 tattctgtat atggaaatac attagaaca acagttaaaa aacctttaa tgaaatatta 300
 attaggtgta ttatatgtca aagaccttg tgcctcaag aaaaaaacg acatgtggat 360
 ttaaacaaac gatttcataa ttttcgggt cgttgggcag ggcgctgtgc ggcgtgttgg 420
 aggtcccgac gtagagaaac tgcactgtga 450

<210> 45
 <211> 450
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 35

<400> 45

atgtttcagg acccagctga acgaccttac aaactgcatg atttgtgcaa cgaggtagaa 60
 gaaagcatcc atgaaatttg tttgaattgt gtatactgca aacaagaatt acagcggagt 120
 gaggtatatg actttgcatg ctatgatttg tgtatagtat atagagaagg ccagccatat 180
 ggagtatgca tgaaatgttt aaaattttat tcaaaaataa gtgaatatag atggtataga 240
 tatagtgtgt atggagaaac gttagaaaa caatgcaaca aacagttatg tcatttatta 300
 attaggtgta ttacatgtca aaaaccgctg tgtccagttg aaaagcaaag acatttagaa 360
 gaaaaaaaaac gattccataa catcgggtga cgggtggacag gtcgggtgat gtccgttgg 420
 aaaccaacac gtagagaaac cgagggtgaa 450

<210> 46
 <211> 477
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 39

<400> 46

```

atggcgcgat ttcacaatcc tgcagaacgg ccatacaaat tgccagacct gtgcacaacg      60
ctggacacca ccttgcagga cattacaata gcctgtgtct attgcagacg accactacag      120

caaaccgagg tatatgaatt tgcatttagt gatttatatg tagtatatag ggacggggaa      180
ccactagctg catgccaatc atgtataaaa ttttatgcta aaatacggga gctacgatat      240
tactcggact cgggtgatgc aactacatta gaaaatataa ctaatacaaa gttatataat      300
ttattaataa ggtgcatgtg ttgtctgaaa ccgctgtgtc cagcagaaaa attaagacac      360
ctaaatagca aacgaagatt tcataaaata gcaggaagct atacaggaca gtgtcgacgg      420
tgctggacca caaacggga ggaccgcaga ctaacacgaa gagaaacca agtataa      477

```

5

<210> 47

<211> 477

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 45

10

<400> 47

```

atggcgcgct ttgacgatcc aaagcaacga ccctacaagc taccagattt gtgcacagaa      60
ttgaatacat cactacaaga cgtatctatt gcctgtgtat attgcaaagc aacattggaa      120
cgcacagagg tatatcaatt tgcttttaaa gatttatgta tagtgtatag agactgtata      180
gcatatgctg catgccataa atgtatagac ttttattcca gaattagaga attaagatat      240
tattcaaact ctgtatatgg agagacactg gaaaaaataa ctaatacaga gttgtataat      300
ttgttaataa ggtgcctgcy gtgccagaaa ccattgaacc cagcagaaaa acgtagacac      360
cttaaggaca aacgaagatt tcacagcata gctggacagt accgagggca gtgtaataca      420
tggtgtgacc aggcacggca agaaagactt cgcagacgta gggaaacaca agtatag      477

```

15

<210> 48

<211> 456

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 51

20

<400> 48

```

atgttcgaag acaagaggga aagaccacga acgctgcatg aattatgtga agctttgaac      60
gtttctatgc acaatatata ggtagtgtgt gtgtattgta aaaaggaatt atgtagagca      120
gatgtatata atgtagcatt tactgaaatt aagattgtat atagggataa taatccatat      180
gcagtatgca aacaatgttt actgttttat tcaaaaatta gagagtatag acgttatagc      240
aggctctgtgt atggtactac attagaggca attactaaaa aaagcttata tgatttatcg      300
ataagggtgtc atagatgtca aagaccactt gggcctgaag aaaagcaaaa attgggtggac      360
gaaaaaaaaa ggttccatga aatagcggga cgttggacgg ggcaatgcyg taattgctgg      420
caacgtacac gacaacgtaa cgaaacccaa gtgtaa      456

```

<210> 49

<211> 447

25

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 52

<400> 49

5

```

atgtttgagg atccagcaac acgacccccg accctgcacg aattgtgtga ggtgctggaa      60

gaatcgggtgc atgaaataag gctgcagtgt gtgcagtgca aaaaagagct acaacgaaga      120
gaggtataca agtttctatt tacagattta cgaatagtat atagagacaa taatccatat      180
ggcgtgtgta ttatgtgcct acgcttttta tctaagataa gtgaatatag gcattatcaa      240
tattcactgt atgggaaaac attagaagag agggtaaaaa aaccattaag tgaaataact      300
attagatgta taatttgtca aacgccatta tgtcctgaag aaaaagaaag acatgttaat      360
gcaaacaagc gatttcataa tattatgggt cgttggacag ggcgtgttc agagtgttg      420
agaccccgac ctgtgaccca agtgtaa      447

```

<210> 50

<211> 465

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 56

<400> 50

10

```

atggagccac aattcaacaa tccacaggaa cgtccacgaa gcctgcacca cttgagtga      60
gtattagaaa tacctttaat tgatcttaga ttatcatgtg tatattgcaa aaaagaacta      120
acacgtgctg aggtatataa ttttgcattg actgaattaa aattagtgtg tagggatgat      180
tttcttatg cagtgtgcag agtatgttta ttgttttata gtaaagttag aaaatatagg      240
tattatgact attcagtgtg tggagctaca ctagaaagta taactaaaaa acagttatgt      300
gatttattaa taagggtgcta cagatgtcaa agtccgttaa ctccggagga aaagcaattg      360
cattgtgaca gaaaaagacg atttcatcta atagcacatg gttggaccgg gtcattgttg      420
gggtgctgga gacaaacatc tagagaacct agagaatcta cagta      465

```

15

<210> 51

<211> 450

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano de tipo 58

<400> 51

20

```

atgttccagg acgcagagga gaaaccacgg acattgcatg atttgtgtca ggcgttggag      60
acatctgtgc atgaaatcga attgaaatgc gttgaatgca aaaagacttt gcagcgatct      120
gaggtatatg actttgtatt tgcagattta agaatagtgt atagagatgg aaatccattt      180
gcagtatgta aagtgtgctt acgattgcta tctaaaataa gtgagtatag acattataat      240
tattcgctat atggagacac attagaacaa acactaaaaa agtgttttaa tgaaatatta      300
attagatgta ttatttgtca aagaccattg tgtccacaag aaaaaaaaag gcatgtggat      360
ttaaacaaaa ggtttcataa tatttcgggt cgttggacag ggcgtgtgtc agtgtgttg      420
agaccccgac gtagacaaac acaagtgtaa      450

```

5	<210> 52		
	<211> 483		
	<212> ADN		
	<213> Virus del papiloma humano de tipo 59		
	<400> 52		
	atggcagcgt ttgaggatcc tacacaacga ccatacaaac tgcctgattt gagcacaaca	60	
	ttgaatatcc ctctgcatga tattcgcacg aattgtgtgt ttgcaaagg ggaactgcaa	120	
	gaaagagagg tatttgaatt tgcttttaat gacttattta tagtgtatag agactgtaca	180	
	ccgtatgcag cgtgtctgaa atgcatttca ttttatgcaa gagtaagaga attaagatat	240	
	tatagagatt ccgtgtatgg agaaacatta gaggctgaaa ccaagacacc gttacatgag	300	
	ctgctgatac gctgttatag atgcctaaaa cctctatgtc caacagataa attaaagcat	360	
	ataactgaaa aaagaagatt ccataatata gctggaatat atacaggaca gtgtcgtggg	420	
	tgctcgaccc gagcaagaca cctaagacag caacgacaag cgcgtagtga aacactggtg	480	
	taa	483	
10	<210> 53		
	<211> 477		
	<212> ADN		
	<213> Virus del papiloma humano de tipo 68		
15	<400> 53		
	atggcgctat ttcacaaccc tgaggaacgg ccatacaaat tgccagacct gtgcaggaca	60	
	ttggacacta cattgcatga cggtacaata gactgtgtct attgcagaag gcaactacaa	120	
	cggacagagg tatatgaatt tgcctttagt gacctatgtg tagtgtatag agacggggta	180	
	ccatttgctg catgccaatc atgtattaaa ttttatgcta aaatacggga actacgatat	240	
	tactcggaat cgggtgatgc aactacatta gaaaccataa ctaatacaaa gttatataat	300	
	ttattgataa ggtgcatgag ttgcctgaaa ccattgtgtc cagcagaaaa actaaggcac	360	
	ctaacaacaa aacgaagatt acataaaaata gcaggaaact ttacaggaca gtgtcggcac	420	
	tgctggacca gtaagcgaga ggaccgcaga cgcatacgtc aagaaacaca agtttaa	477	
20	<210> 54		
	<211> 318		
	<212> ADN		
	<213> Virus del papiloma humano de tipo 18		
25	<400> 54		
	atgcatggac ctaaggcaac attgcaagac attgtattgc atttagagcc ccaaaatgaa	60	
	attccgggtg accttctatg tcacgagcaa ttaagcgact cagaggaaga aaacgatgaa	120	
	atagatggag ttaatcatca acatttacca gcccgcagag ccgaaccaca acgtcacaca	180	
	atgttgtgta tgtgttgtaa gtgtgaagcc agaattaagc tagtagtaga aagctcagca	240	
	gacgaccttc gagcattcca gcagctgttt ctgaacaccc tgcctttgt gtgtccgtgg	300	
	tgtgcatccc agcagtaa	318	

ES 2 391 451 T3

5	<210> 55 <211> 297 <212> ADN <213> Virus del papiloma humano de tipo 31 <400> 55	
	atgcgtggag aaacacctac gttgcaagac tatgtgttag atttgcaacc tgaggcaact 60 gacctccact gttatgagca attacccgac agctcagatg aggaggatgt catagacagt 120 ccagctggac aagcagaacc ggacacatcc aattacaata tcgttacctt ttgttgtcag 180 tgtaagtcta cacttcgttt gtgtgtacag agcacacaag tagatattcg catattgcaa 240 gagctgttaa tgggtcatt tggaatcgtg tgccccaact gttctactag actgtaa 297	
10	<210> 56 <211> 294 <212> ADN <213> Virus del papiloma humano de tipo 33 <400> 56	
15	atgagaggac acaagccaac gttaaaggaa tatgttttag atttatatcc tgaaccaact 60 gacctatact gctatgagca attaagtgac agctcagatg aggatgaagg cttggaccgg 120 ccagatggac aagcacaacc agccacagct gattactaca ttgtaacctg ttgtcacact 180 tgtaacaacca cagttcgttt atgtgtcaac agtacagcaa gtgacctacg aaccatacag 240 caactactta tgggcacagt gaatattgtg tgccctacct gtgcacaaca ataa 294	
20	<210> 57 <211> 300 <212> ADN <213> Virus del papiloma humano de tipo 35 <400> 57	
25	atgcatggag aaataactac attgcaagac tatgttttag atttggaacc cgaggcaact 60 gacctatact gttatgagca attgtgtgac agctcagagg aggaggaaga tactattgac 120 ggtccagctg gacaagcaaa accagacacc tccaattata atattgtaac gtccctgttgt 180 aaatgtgagg cgacactacg tctgtgtgta cagagcacac acattgacat acgtaaattg 240 gaagatttat taatgggcac atttggaata gtgtgccccg gctgttcaca gagagcataa 300	
30	<210> 58 <211> 330 <212> ADN <213> Virus del papiloma humano de tipo 39 <400> 58	
35		

atgCGTggac caaagccac cttgcaggaa attgtattag atttatgtcc ttacaatgaa 60
 atacagccgg ttgacctgt atgtcacgag caattaggag agtcagagga tgaaatagat 120
 gaacccgacc atgcagttaa tcaccaacat caactactag ccagacggga tgaaccacag 180
 cgtcacacaa tacagtgttc gtgttgtaag tgtaacaaca cactgcagct ggtagtagaa 240
 gcctcaggg atactctgcg acaactacag cagctgttta tggactcact aggatattgtg 300
 tgtccgtggg gtgcaactgc aaaccagtaa 330

<210> 59
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 45

<400> 59

atgcattggac cccgggaaac actgcaagaa attgtattgc atttggaaac tcagaatgaa 60
 ttagatcctg ttgacctgt gtgttacgag caattaagcg agtcagagga ggaaaacgat 120
 gaagcagatg gagttagtca tgcacaacta ccagcccgac gagccgaacc acagcgtcac 180
 aaaattttgt gtgtatgttg taagtgtgac ggcagaattg agcttacagt agagagctcg 240
 gcagaggacc ttagaacact acagcagctg tttttgagca ccttgcctt tgtgtgtccg 300
 tgggtgtgcaa ctaaccaata a 321

<210> 60
 <211> 306
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 51

<400> 60

atgcgtggta atgtaccaca attaaaagat gtagtattgc atttaacacc acagactgaa 60
 attgacttgc aatgctacga gcaatttgac agctcagagg aggaggatga agtagataat 120
 atgcgtgacc agctaccaga aagacgggct ggacaggcta cgtgttacag aattgaagct 180
 ccgtgttgca ggtgttcaag ttagtagaaa ctggcagtgg aaagcagtgg agacaccctt 240
 cgcgttgtac agcagatgtt aatgggcgaa ctaagcctgg tttgcccggtg ttgtgcgaac 300
 aactag 306

<210> 61
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 52

<400> 61

atgcgtggag acaaagcaac tataaaagat tatatattag atctgcaacc tgaacaact 60
gacctacact gctatgagca attaggtgac agctcagatg aggaggatac agatgggtgtg 120
gaccggccag atggacaagc agaacaagcc acaagcaatt actacattgt gacatattgt 180
cacagttgtg atagcacact acggctatgc attcatagca ctgcgacgga ccttcgtact 240
ctacagcaaa tgctgttggg cacattacaa gttgtgtgcc cgggctgtgc acggctataa 300

<210> 62
<211> 318
<212> ADN
<213> Virus del papiloma humano de tipo 56

<400> 62

atgcatggta aagtaccaac gctgcaagac gttgtattag aactaacacc tcaaacagaa 60
attgacctac agtgcaatga gcaattggac agctcagagg atgaggatga ggatgaagta 120
gaccatttgc aggagcggcc acagcaagct agacaagcta aacaacatac gtgttaccta 180
atacacgtac cttgttgtga gtgtaagttt gtggtgcagt tggacattca gagtacaaaa 240
gaggacctgc gtgttgtaca acagctgctt atgggtgcgt taacagtaac gtgcccactc 300
tgcgcatcaa gtaactaa 318

<210> 63
<211> 297
<212> ADN
<213> Virus del papiloma humano de tipo 58

<400> 63

atgagaggaa acaacccaac gctaagagaa tatatttttag atttacatcc tgaaccaact 60
gacctattct gctatgagca attatgtgac agctcagacg aggatgaaat aggcttggac 120
gggccagatg gacaagcaca accggccaca gctaattact acattgtaac ttgttgttac 180
acttgtggca ccacggttcg tttgtgtatc aacagtacaa caaccgacgt acgaacccta 240
cagcagctgc ttatgggcac atgtaccatt gtgtgcccta gctgtgcaca gcaataa 297

<210> 64
<211> 324
<212> ADN
<213> Virus del papiloma humano de tipo 59

<400> 64

```

atgcatggac caaaagcaac actttgtgac attgttttag atttgggaacc acaaaattat      60
gaggaagttg accttgtgtg ctacgagcaa ttacctgact ccgactccga gaatgaaaaa      120
gatgaaccag atggagttaa tcatcctttg ctactagcta gacgagctga accacagcgt      180
cacaacattg tgtgtgtgtg ttgtaagtgt aataatcaac ttcagctagt agtagaaacc      240
tcgcaagacg gattgcgagc cttacagcag ctgtttatgg acacactatc ctttgtgtgt      300
cctttgtgtg cagcaaacca gtaa                                              324

```

<210> 65
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano de tipo 68

<400> 65

```

atgcatggac caaagccac cgtgcaggaa attgtgttag agctatgtcc atacaatgaa      60
atacagccgg ttgaccttgt atgtcacgag caattaggag attcagacga tgaaatagat      120
gaacccgacc atgcagttaa tcaccaccaa catctactac tagccagacg ggacgaacaa      180
cagcgtcaca gaattcagtg tctgtgttgt aagtgtaca aggcactgca actagtagta      240
gaagcgtgcg gggacaacct gcggacacta caacagctgt ttatggactc actaaatfff      300
gtgtgtccgt ggtgtgcaac tgaaacccag taa                                  333

```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende polipéptidos E6 y E7 del virus del papiloma humano, en el que el polipéptido E7 precede al polipéptido E6 y tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 24 y 26 de la SEC ID N°: 14 y el polipéptido E6 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 63 y 106 de la SEC ID N°: 13.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el E7 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 24, 26 y 91 de la SEC ID N°: 14 y el polipéptido E6 tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 63 y 106 de la SEC ID N°: 13.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 en el que los aminoácidos mutados están mutados a glicina.
4. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una célula huésped aislada que expresa el polipéptido de la reivindicación 1.
6. Una composición inmunogénica que comprende:
 - (a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable o;
 - (b) el ácido nucleico de la reivindicación 4.
7. La composición inmunogénica de la reivindicación 6 que comprende adicionalmente adyuvante.
8. Un virus recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 4.
9. El virus recombinante de la reivindicación 8, en el que el virus es un virus de la encefalitis equina venezolana modificado.
10. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 9 o en la SEC ID N°: 11.
11. Un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 4, que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 9 o en la SEC ID N°: 11.
12. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 11 que tiene la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 10 o en la SEC ID N°: 12.
13. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 4, 11 ó 12 bajo el control de una secuencia de control de la expresión.
14. Una célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 4 o el vector de expresión de la reivindicación 13.
15. Uso de la composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6 o el vector de expresión de la reivindicación 13 en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer cervical.
16. Uso de la composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6 o el vector de expresión de la reivindicación 13 en la fabricación de un medicamento para prevenir cáncer cervical.

Figura 1A

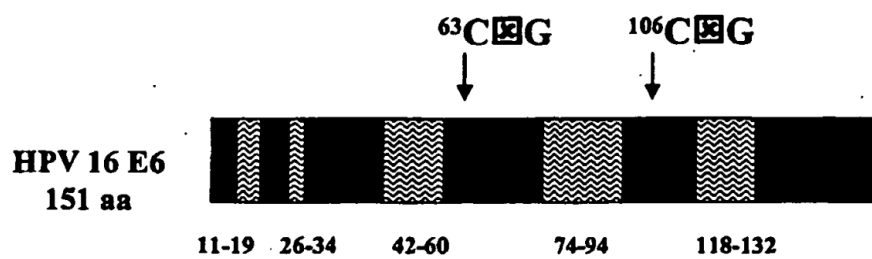
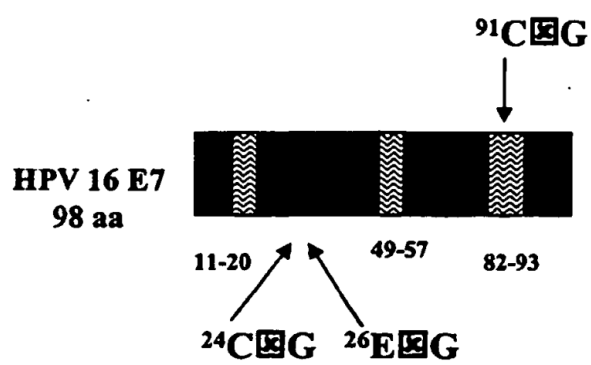


Figura 1B



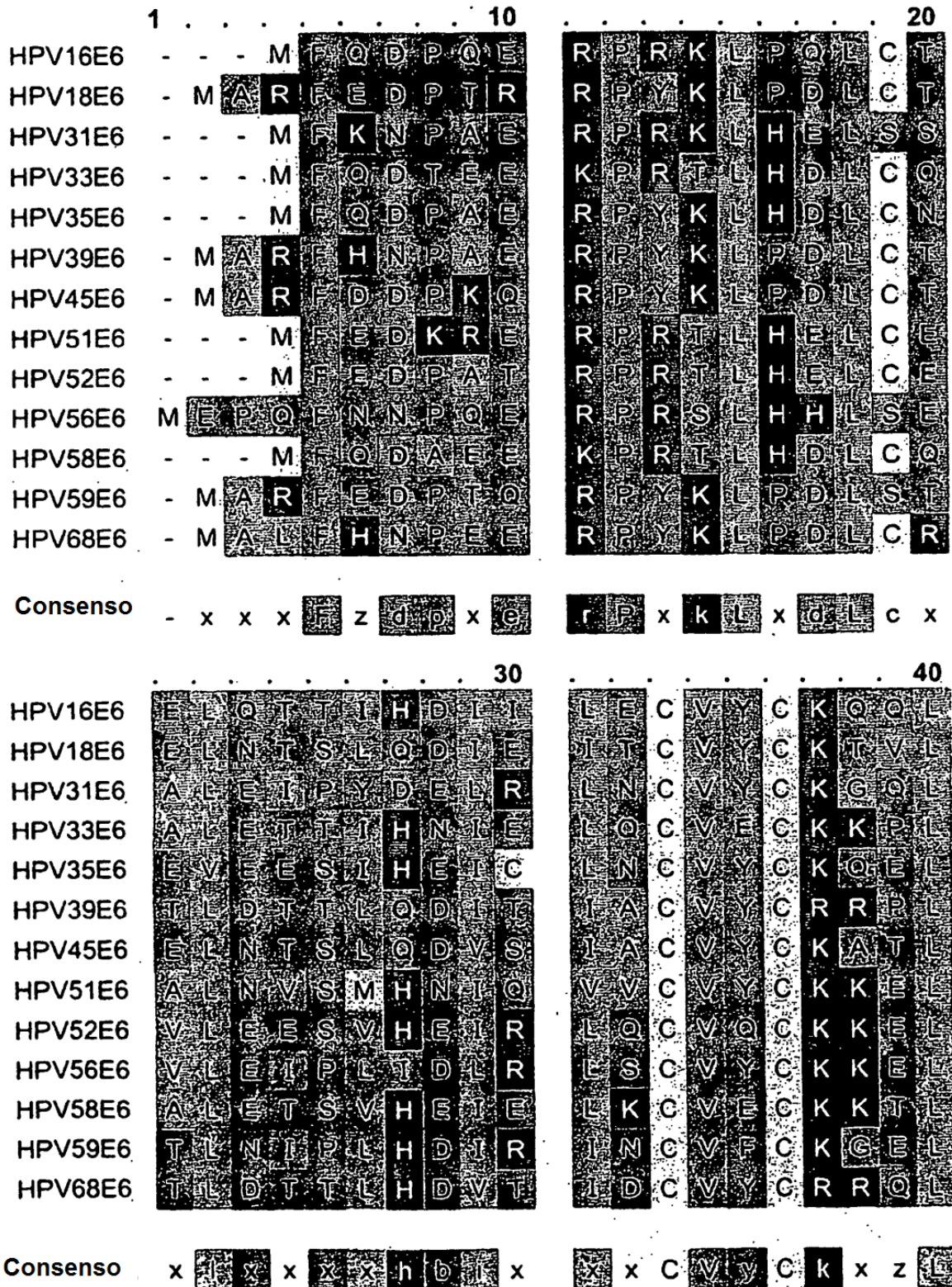


Figura 2A

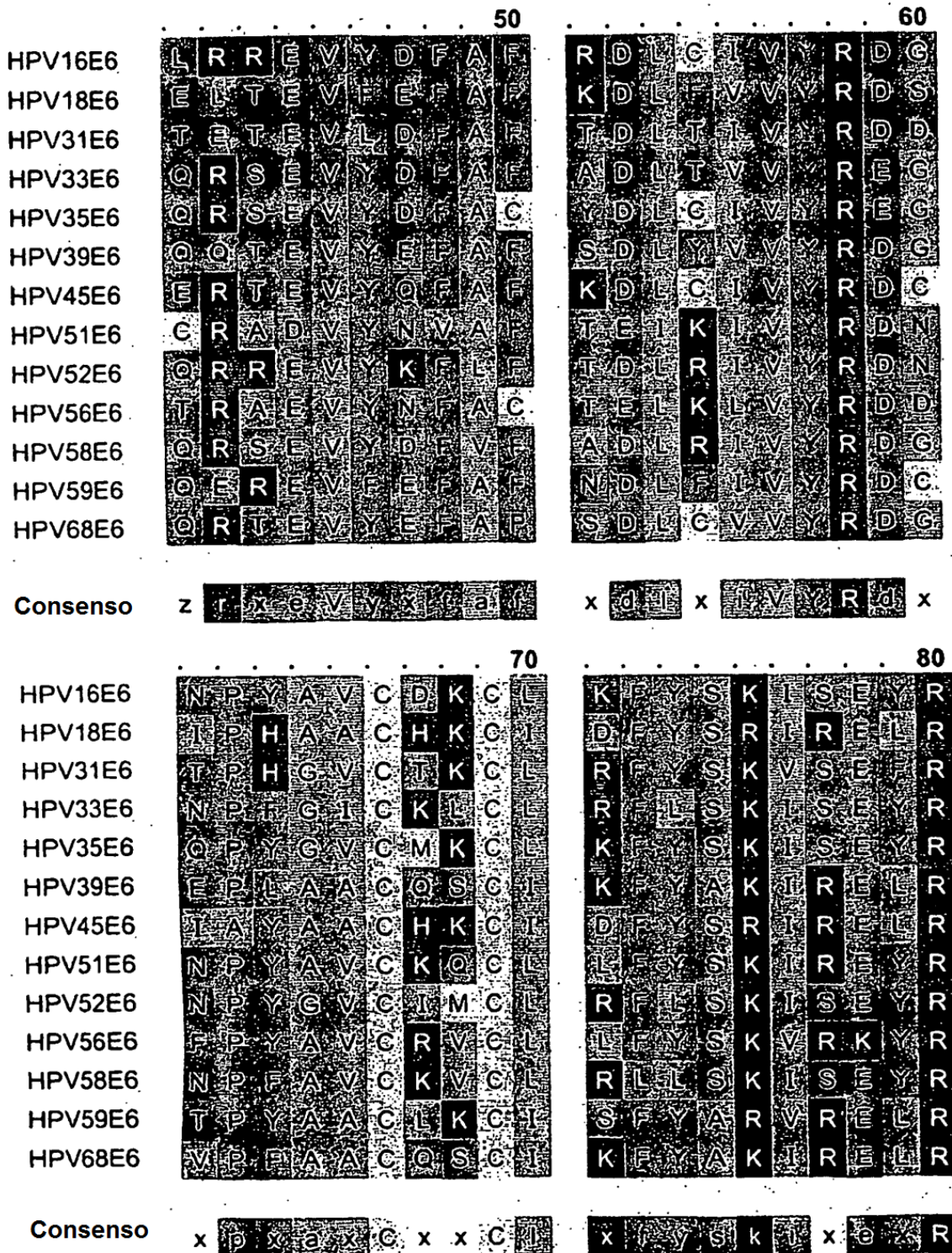


Figura 2B

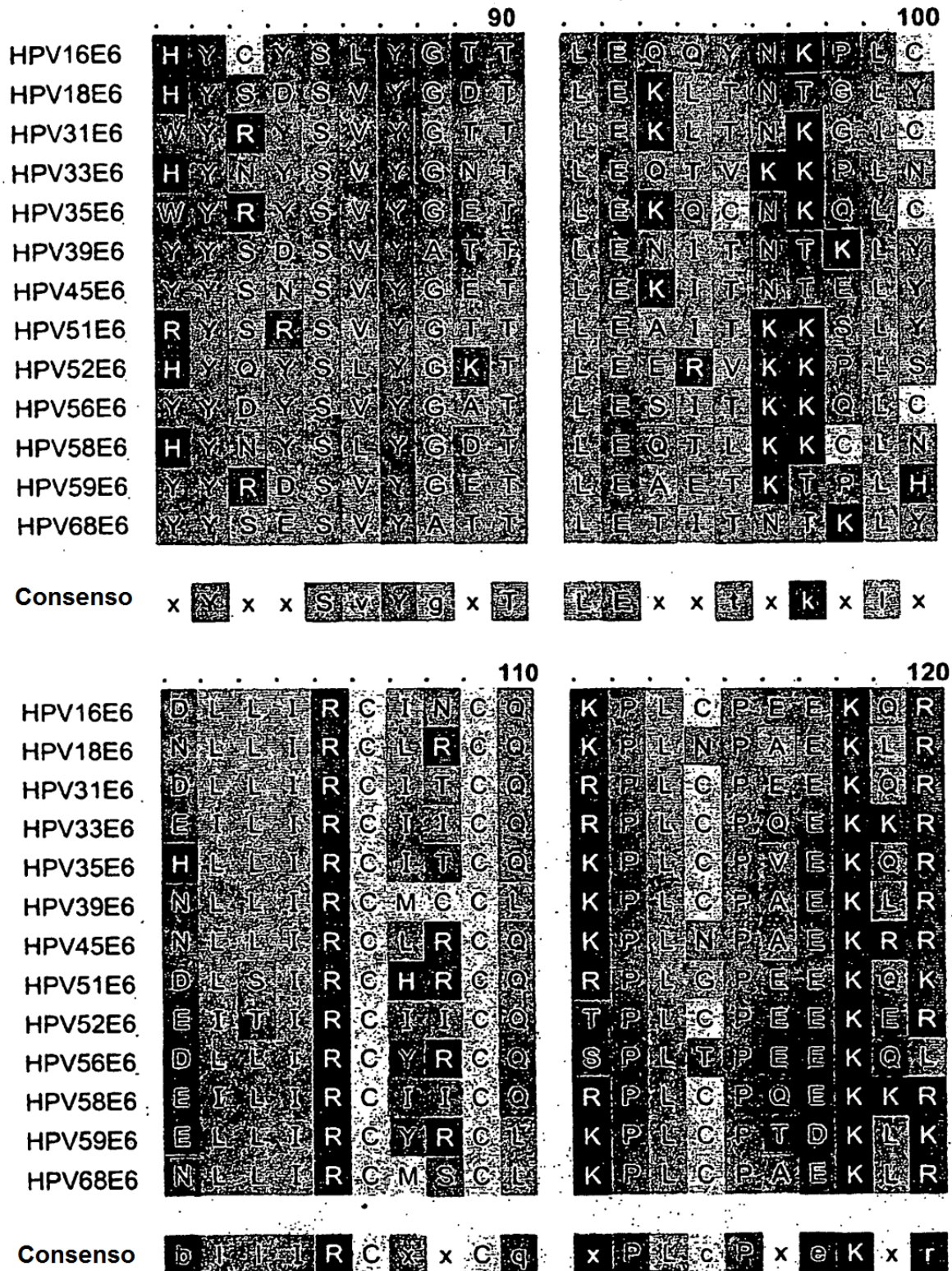


Figura 2C

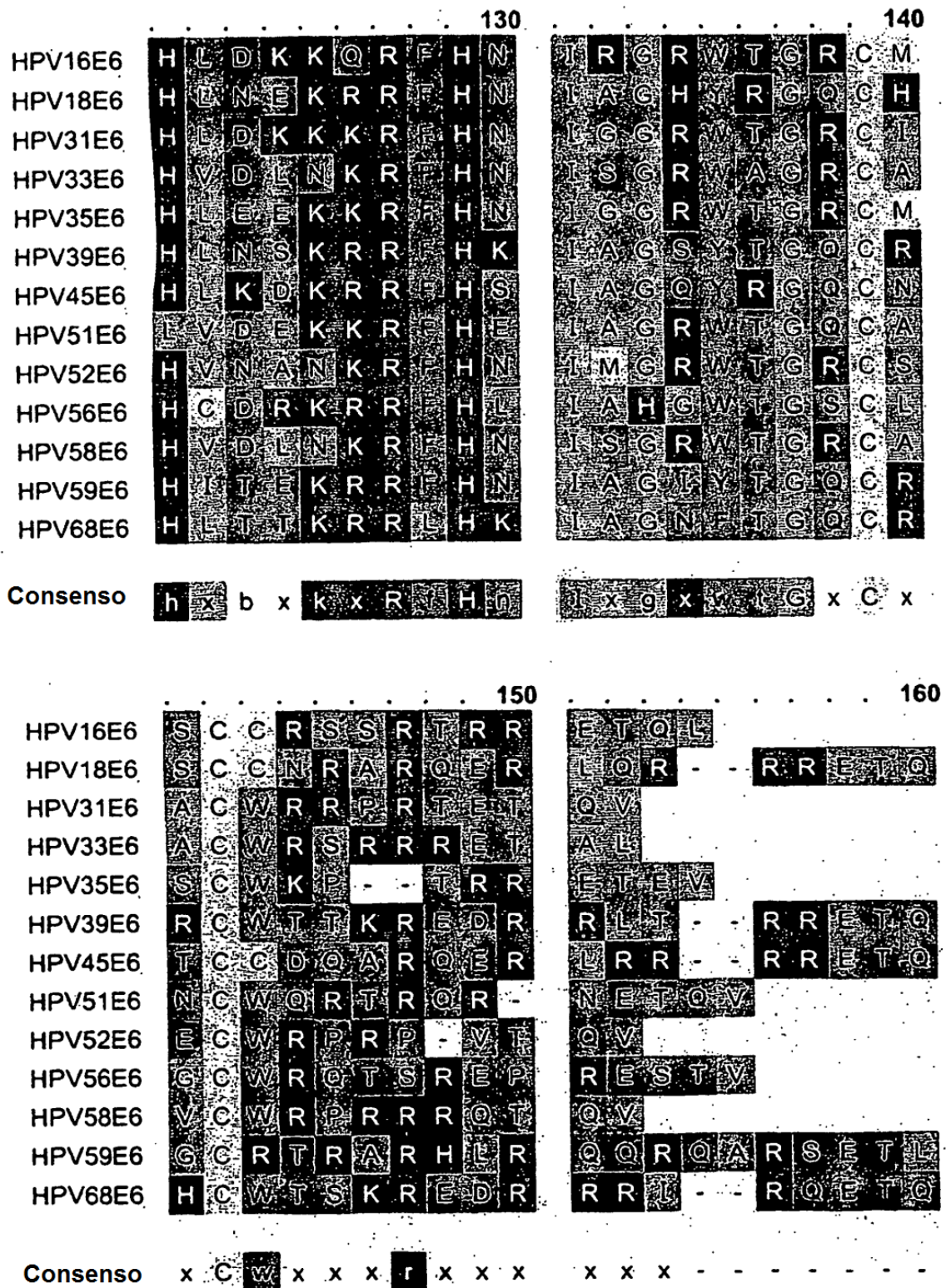


Figura 2D

		170	180
HPV16E6			
HPV18E6			
HPV31E6			
HPV33E6			
HPV35E6			
HPV39E6			
HPV45E6			
HPV51E6			
HPV52E6			
HPV56E6			
HPV58E6			
HPV59E6			
HPV68E6			
Consenso	-		

Figura 2E

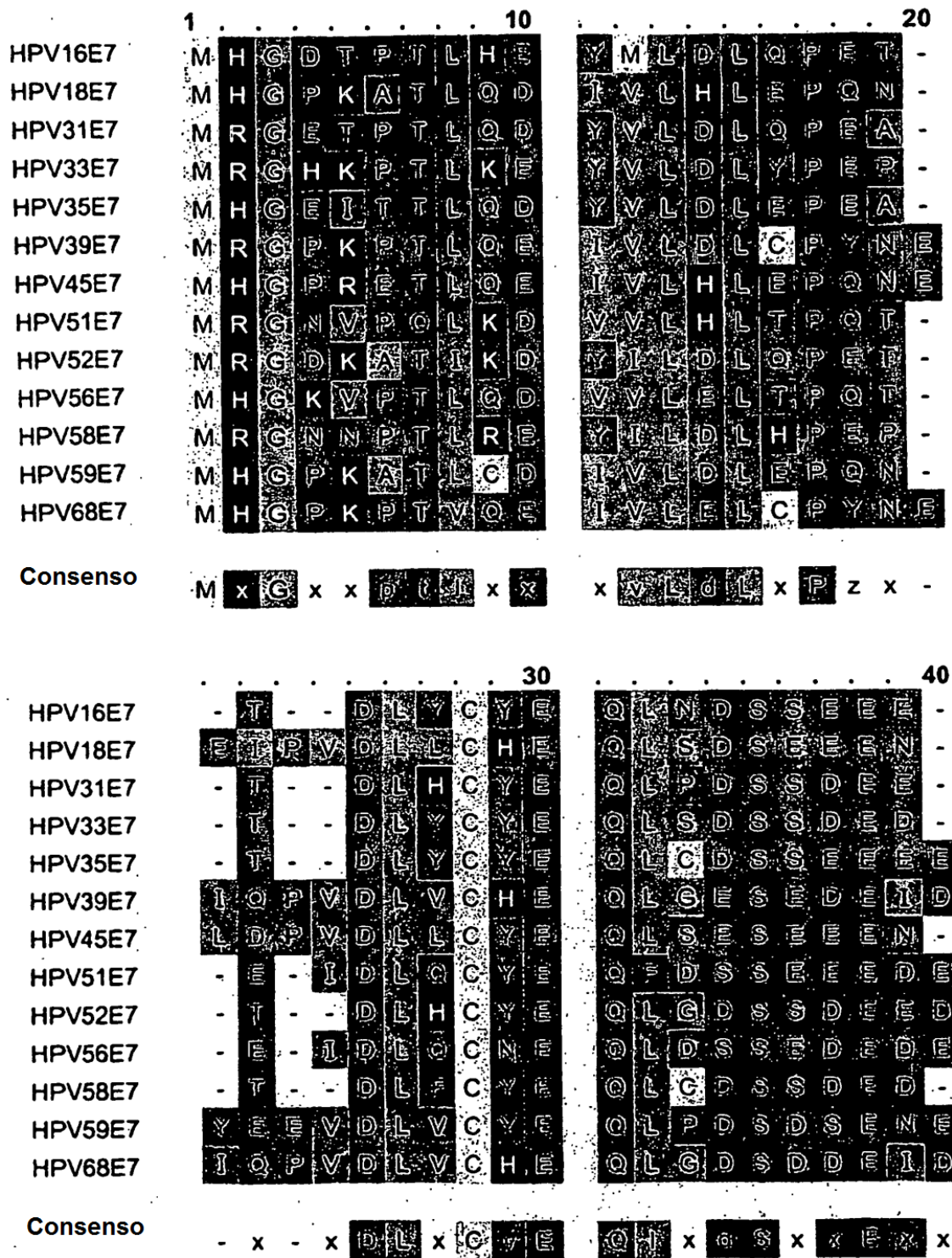


Figura 3A

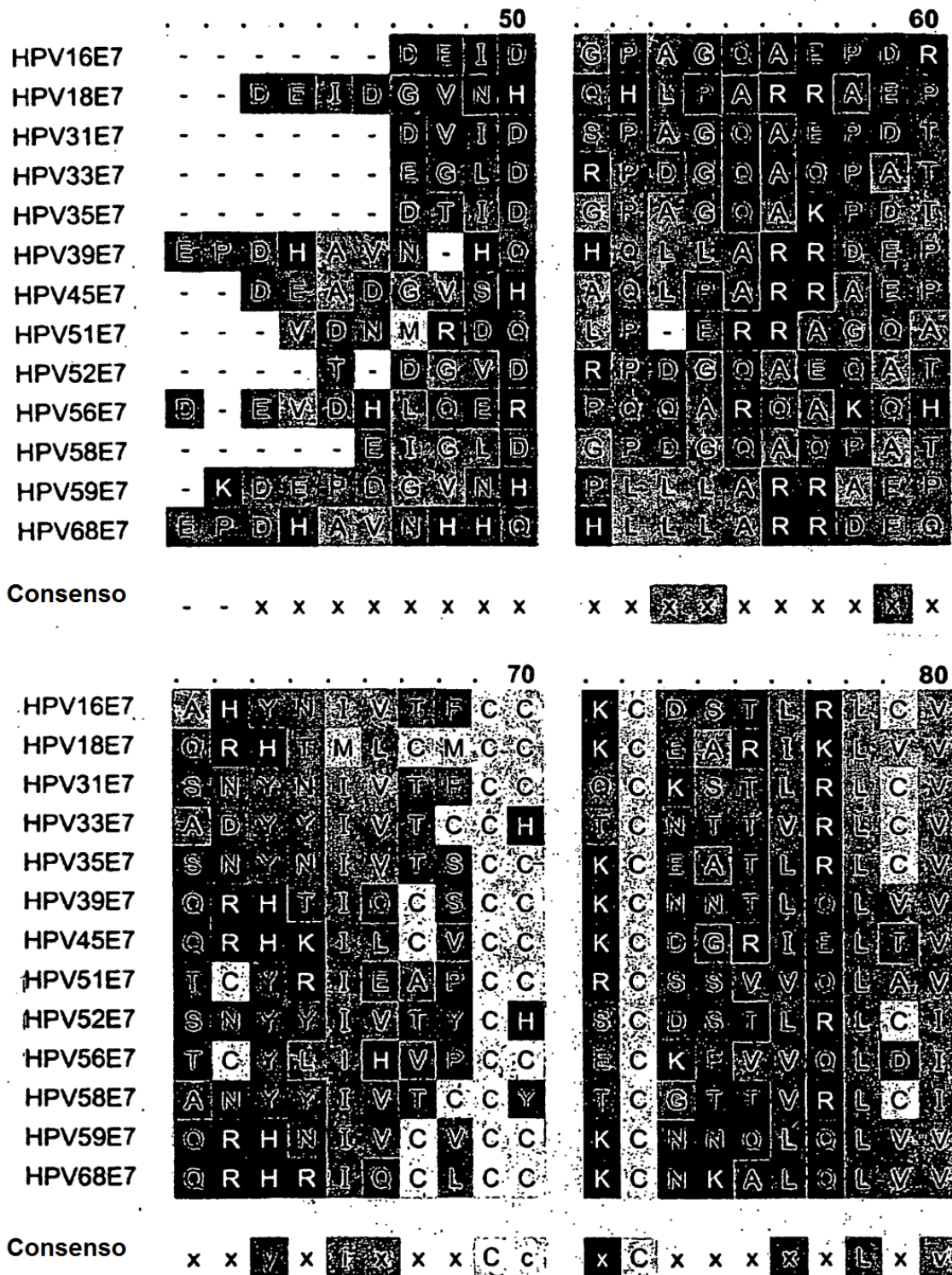


Figura 3B

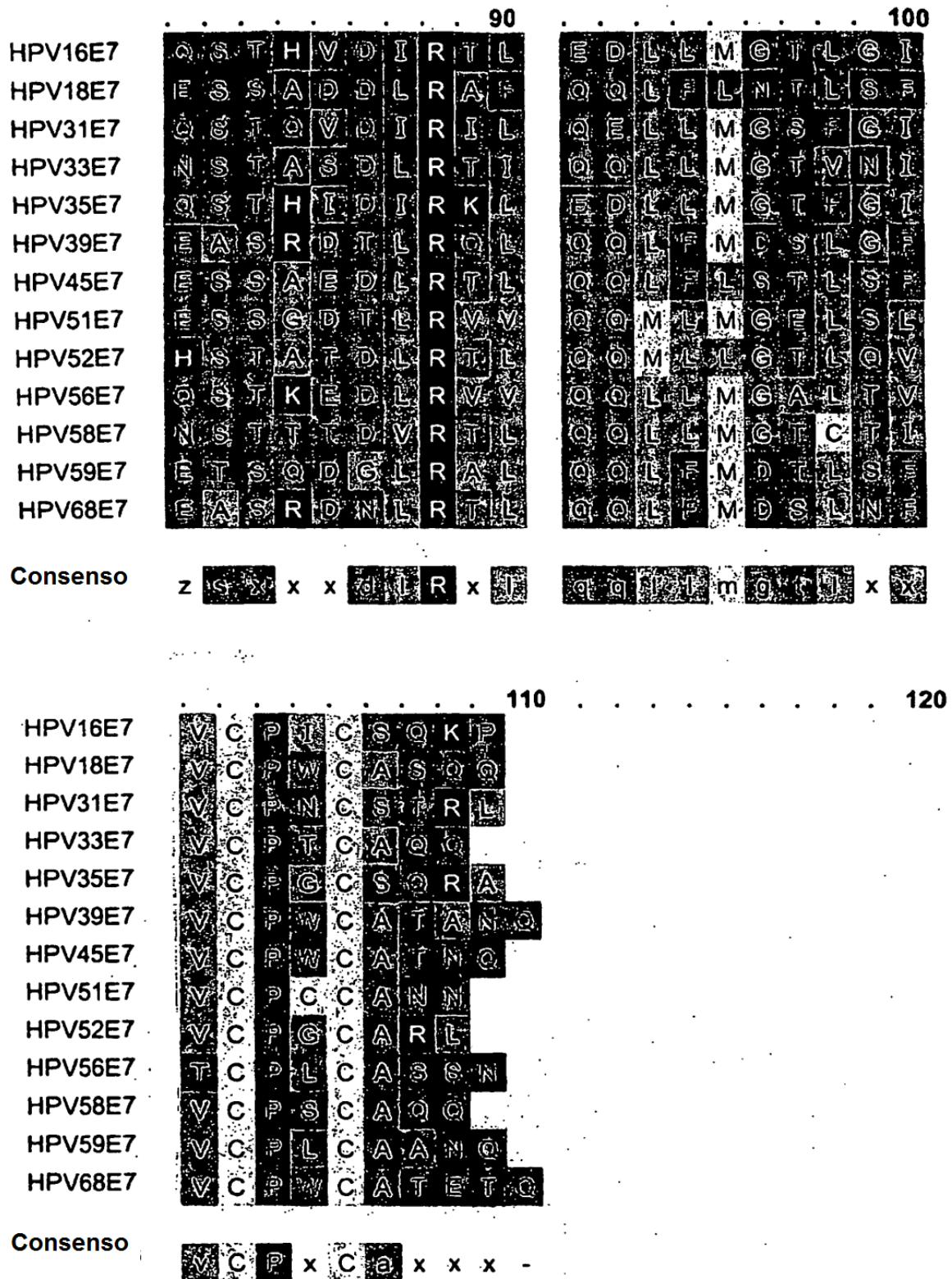


Figura 3C

Figura 4

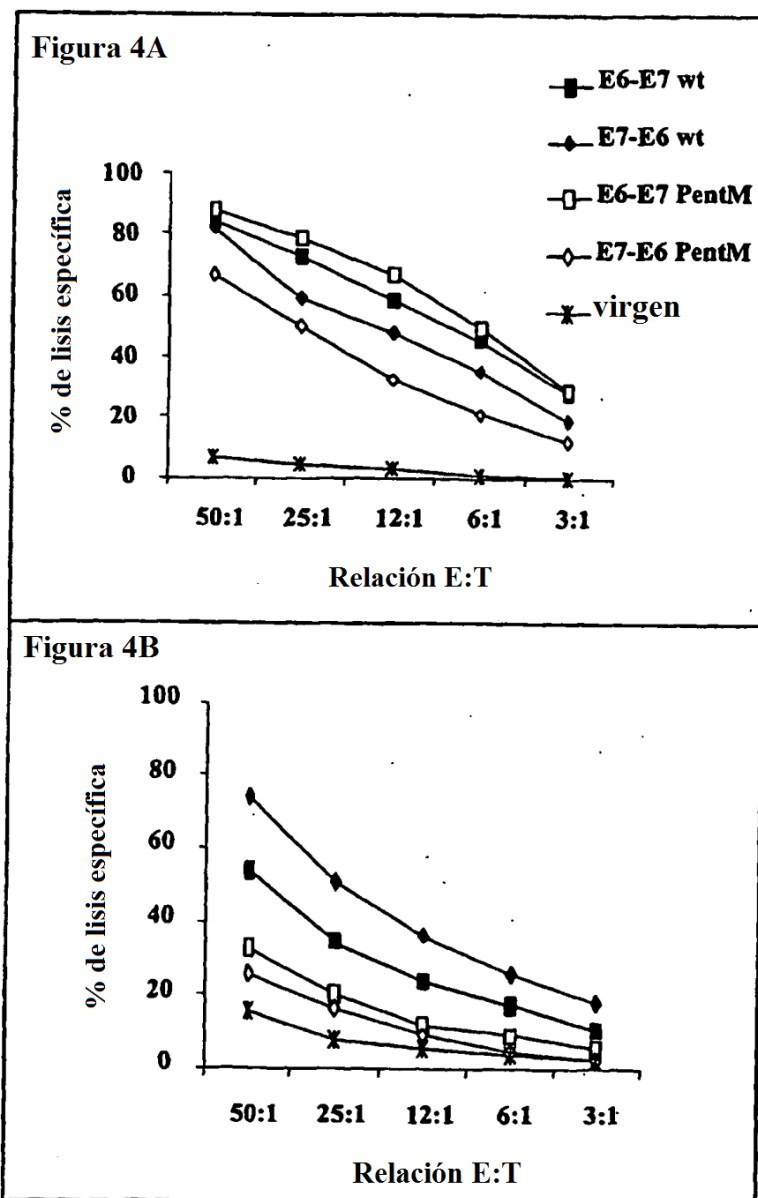


Figura 5

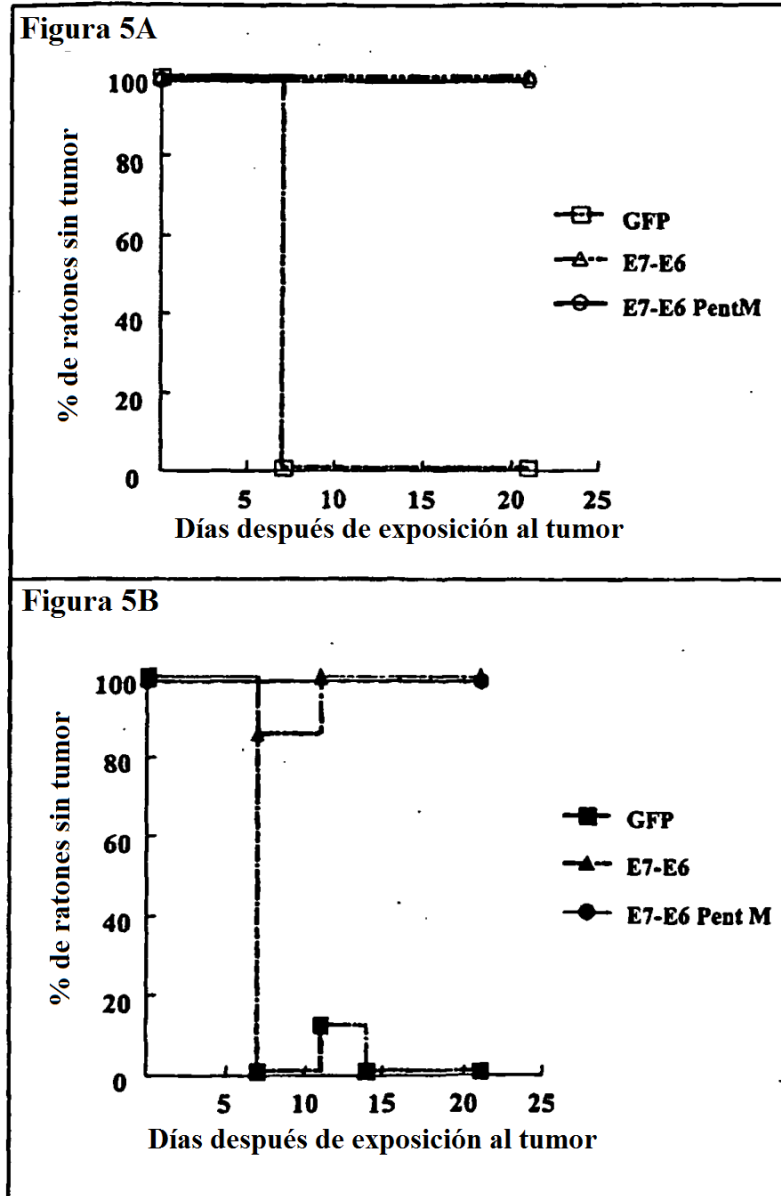


Figura 6

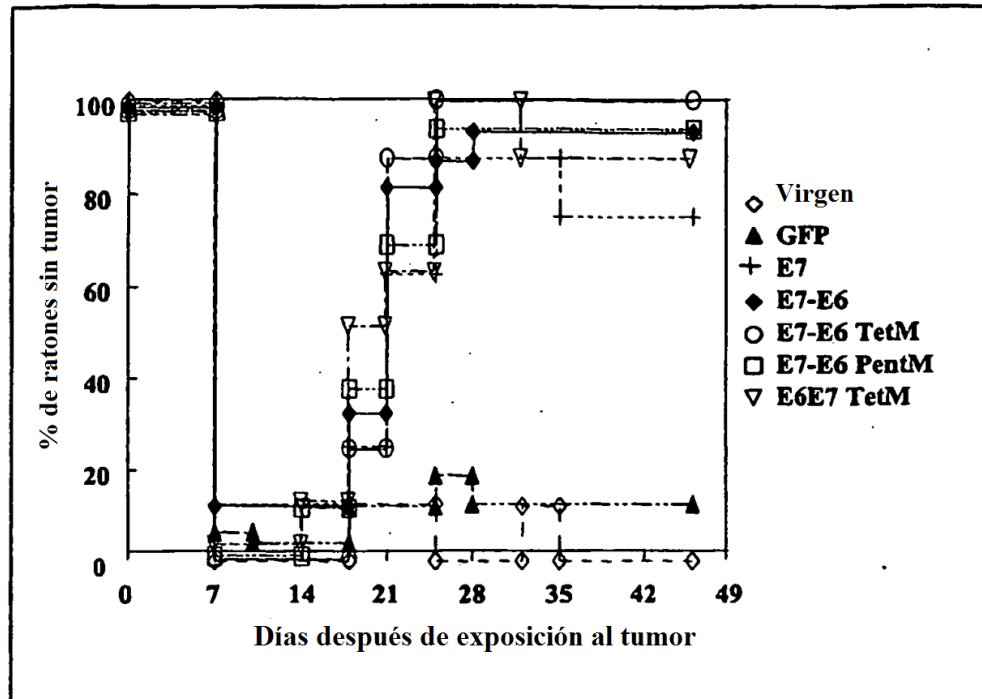


Figura 7

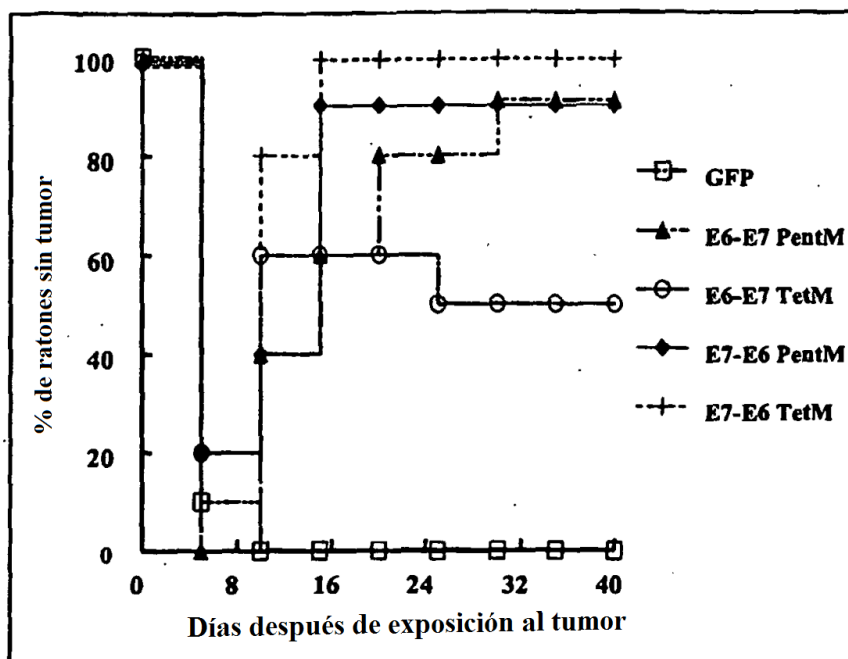


Figura 8

