

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 361**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2008 E 08708348 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2162544**

54 Título: **Vectores para la expresión de múltiples genes**

30 Prioridad:

15.05.2007 EP 07360019

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.07.2013

73 Titular/es:

**TRANSGENE SA (100.0%)
PARC D'INNOVATION BOULEVARD GONTHIER D
ANDERNACH
67400 ILLKIRCH GRAFFENSTADEN, FR**

72 Inventor/es:

**SILVESTRE, NATHALIE y
SCHMITT, DORIS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 416 361 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores para la expresión de múltiples genes.

5 La presente invención se refiere a un vector recombinante diseñado para expresar de forma independiente múltiples secuencias de nucleótidos de interés que se obtienen a partir del mismo organismo o de organismos estrechamente relacionados. La presente invención pertenece al sector de la tecnología del ácido nucleico recombinante para la expresión de múltiples secuencias de nucleótidos que presentan homología entre sí en diversos sistemas *in vitro* procariontes y eucariotes, o en un individuo animal o humano, con fines terapéuticos o profilácticos. La presente
10 invención es particularmente útil en el campo de la inmunoterapia, especialmente en el tratamiento o la prevención de estados patológicos causados por organismos infecciosos como el virus del papiloma o el virus de la hepatitis.

La tecnología del ADN recombinante ha hecho posible la expresión de secuencias de nucleótidos en células hospedadoras cultivadas o en organismos vivos. Se han generado y utilizado diversos ADN plasmídicos y vectores víricos para una variedad de propósitos, incluidos la vacunación, la terapia génica, la inmunoterapia y la expresión
15 en células cultivadas. Los vectores, como los vectores adenovíricos y poxvíricos, tienen la ventaja de que poseen una gran capacidad de clonación, con capacidad para expresar múltiples secuencias de nucleótidos en una amplia gama de células hospedadoras. La expresión de múltiples secuencias de nucleótidos puede resultar ventajosa para mejorar la eficacia terapéutica proporcionada por los polipéptidos codificados (por ejemplo, combinando la inmunidad humoral y la celular). En lugar de producir una serie de vectores recombinantes diseñados por separado para expresar cada una de las secuencias de nucleótidos deseadas, sería ventajoso producir un único vector recombinante, por lo menos, para facilitar las etapas de producción y la aprobación de la autoridad competente.

Por ejemplo, en el caso de las infecciones por el virus del papiloma, sería deseable expresar polipéptidos inmunógenos de diversos genotipos del virus del papiloma con el fin de ampliar o reforzar la respuesta inmunitaria del hospedador, especialmente en sujetos con riesgo de infecciones múltiples, por ejemplo de VPH-16 y VPH-18. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos que codifican dichos polipéptidos inmunógenos son altamente homólogas entre los genotipos relacionados del VPH. Por ejemplo, las secuencias E6 de VPH-16 y E6 de VPH-18, que muestran una homología global del 63% en el nivel de los nucleótidos, comprenden, sin embargo, regiones concretas con una homología muy alta, mayor del 75%, lo que puede llegar a impedir la expresión de los genes de VPH-16 y VPH-18 a partir de un único vector.

Por otro lado, cuando se expresan polipéptidos de origen vírico, también pueden surgir secuencias de nucleótidos homólogas a causa de la organización global del genoma vírico. Es bastante frecuente que un virus utilice la misma secuencia de nucleótidos para codificar dos proteínas diferentes a través de mecanismos biológicos tales como la iniciación de la traducción interna o el desplazamiento del marco de lectura, es decir, que la misma secuencia de ADN se traduce en más de un marco de lectura. Por ejemplo, en el genoma de VPH-16, los genes adyacentes E1 y E2 se solapan en más de 59 nucleótidos que se traducen en diferentes marcos de lectura. Dicho de otro modo, los últimos 59 nucleótidos del gen E1 se solapan con los primeros 59 nucleótidos del gen E2.

Sin embargo, se prevé que la presencia de secuencias homólogas en un vector influya negativamente en su estabilidad, especialmente durante las etapas de producción del mismo, provocando la pérdida de secuencias génicas debido a eventos de recombinación que se producen entre las secuencias homólogas. Por consiguiente, la expresión de los genes E1 y E2 de VPH-16 en un único vector implica la presencia de una porción común de 59 nucleótidos que podría provocar potencialmente eventos de recombinación homóloga y, en última instancia, la pérdida de las secuencias comprendidas entre las secuencias homólogas de E1 y E2. Este tipo de eventos de recombinación homóloga no deseados también pueden tener lugar cuando se expresan las secuencias génicas de VPH-16 y VPH-18 en el mismo vector. Este problema de inestabilidad puede hacer que la reserva de vector sea inservible, especialmente para ensayos clínicos en humanos.

En este sentido, el documento WO 92/16636 propone insertar en el vector recombinante las secuencias de nucleótidos homólogas en una orientación recíprocamente opuesta, con el fin de reducir la probabilidad de que se produzcan eventos de recombinación. Sin embargo, esta estrategia se ha descrito en referencia a un vector del virus de la vaccinia, no para otros vectores recombinantes, como los adenovirus. Por otro lado, la disposición en una orientación opuesta no siempre es posible debido a la posible interferencia de promotores y restricciones constructivas.

En la técnica hay una necesidad de generar vectores recombinantes capaces de expresar en una célula hospedadora o en un individuo secuencias de nucleótidos obtenidas a partir del mismo organismo o de organismos estrechamente relacionados, que, en el contexto nativo, contienen porciones con una homología elevada. La presente invención aborda esta necesidad dando a conocer una nueva estrategia diseñada para minimizar la probabilidad de que se produzcan eventos de recombinación mediante la alteración de una o ambas secuencias de nucleótidos homólogas utilizando la degeneración del código genético para hacer que sean menos homólogas que antes de la modificación, a la vez que no se altera, o no de forma significativa, la secuencia de aminoácidos codificada. La presente invención permite eludir el efecto nocivo de la recombinación homóloga que se produce entre secuencias homólogas, especialmente durante las etapas de producción de los vectores, y que provocan la

pérdida de secuencias de nucleótidos contenidas entre las mismas. Se ha puesto de manifiesto que el vector según la presente invención es sorprendentemente eficaz en la expresión de los genes E1 y E2 del virus del papiloma, que en el contexto nativo comparten una porción 100% homóloga de 59 nucleótidos, y es sorprendentemente estable durante las etapas de producción. También se ha puesto de manifiesto que el vector según la presente invención es sorprendentemente eficaz en la expresión de los genes E6 y E7 obtenidos a partir de los genotipos estrechamente relacionados VPH-16 y VPH-18.

Este problema técnico se resuelve mediante la disposición de las formas de realización tal como se definen en las reivindicaciones.

Otros aspectos, características y ventajas, distintos y adicionales, de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las formas de realización preferidas de la misma. Dichas formas de realización se indican a efectos divulgativos.

De este modo, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer un vector que comprende, por lo menos, una primera molécula de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en el que:

- dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico se obtienen, respectivamente, a partir de una primera y una segunda secuencias de ácido nucleico nativo que presentan un porcentaje de homología de aproximadamente el 80% o mayor del 80% en una porción de 40 o más nucleótidos continuos, y
- dicha primera molécula de ácido nucleico y/o dicha segunda molécula de ácido nucleico comprendidas en el vector se modifican a fin de reducir dicho porcentaje de homología a menos del 75%.

Tal como se utilizan a lo largo de la presente solicitud, los términos “un”, “uno” y “una” se refieren a “por lo menos uno”, “por lo menos un primer”, “uno o más” o “una pluralidad” de los compuestos o etapas a los que se hace referencia, a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, en el término “una célula” se incluye una pluralidad de células, incluida una mezcla de las mismas.

Allí donde se utilice en la presente memoria, la expresión “y/o” incluye los significados de “y”, “o” y “todos los elementos conectados por dicho término o cualquier otra combinación de los mismos”. Por ejemplo, “la primera molécula de ácido nucleico y/o la segunda molécula de ácido nucleico” se refiere a la primera molécula de ácido nucleico, o bien a la segunda molécula de ácido nucleico, o bien a la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “alrededor de” o “aproximadamente” significa dentro de un margen del 5%, preferentemente dentro de un margen del 4%, y más preferentemente dentro de un margen del 2%, alrededor de un valor o intervalo dado.

Tal como se utiliza en la presente memoria para definir productos, composiciones y métodos, el término “que comprende” se refiere al hecho de que los productos, composiciones y métodos incluyen los componentes o etapas especificados, pero sin excluir otros. La expresión “que consiste esencialmente en” significa con exclusión de otros componentes o etapas de importancia esencial. Por consiguiente, una composición “que consiste esencialmente en” los componentes citados no excluye trazas de contaminantes ni vehículos farmacéuticamente aceptables. La expresión “que consiste en” significa con exclusión de elementos más que traza de otros componentes o etapas. Por ejemplo, un polipéptido “consiste en” una secuencia de aminoácidos cuando dicho polipéptido no contiene ningún aminoácido más allá de la secuencia de aminoácidos especificada. Un polipéptido “consiste esencialmente en” una secuencia de aminoácidos cuando dicha secuencia de aminoácidos está presente junto con unos pocos residuos de aminoácidos adicionales, típicamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 residuos adicionales. Un polipéptido “comprende” una secuencia de aminoácidos cuando la secuencia de aminoácidos es, como mínimo, parte de la secuencia de aminoácidos final del polipéptido. Dicho polipéptido puede tener entre unos pocos y varios centenares de residuos de aminoácidos adicionales. Dichos residuos de aminoácidos adicionales pueden tener un papel en el tráfico de polipéptidos, facilitar la producción o purificación de polipéptidos y prolongar su semivida, entre otras cosas. Lo mismo se puede aplicar a las secuencias de nucleótidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “vector” puede ser cualquier agente capaz de suministrar y expresar, por lo menos, la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico en una célula hospedadora o individuo. El vector puede ser extracromosómico (por ejemplo, un episoma) o de integración (para incorporarse a los cromosomas del hospedador), de replicación autónoma o no, multicopia o de bajo número de copias, bicatenario o monocatenario, desnudo o complejo con otras moléculas (por ejemplo, vectores complejados con lípidos o polímeros para formar estructuras particuladas, tales como liposomas, lipoplexos o nanopartículas, vectores empaquetados en una cápside vírica y vectores inmovilizados sobre partículas en fase sólida, etc.). La definición del término “vector” también comprende vectores que han sido modificados para permitir su direccionamiento preferencial hacia una determinada célula hospedadora. Un rasgo característico de los vectores dirigidos es la presencia en su superficie de un ligando capaz de reconocer un componente celular y expuesto en la superficie, tal como un marcador específico de célula

(por ejemplo, una célula infectada por el VPH), un marcador específico de tejido o un marcador específico del tumor, y de unirse al mismo. El ligando se puede insertar genéticamente en un polipéptido presente en la superficie del vector (por ejemplo, fibra adenovírica, pentona, pIX, tal como se describe en los documentos WO 94/10323 y WO 02/96939, o producto del gen p14 de vaccinia, tal como se describe en el documento EP 1 146 125).

En el contexto de la presente invención, los términos “ácido nucleico”, “molécula de ácido nucleico”, “polinucleótido” y “secuencia de nucleótidos” se utilizan indistintamente y se refieren a un polímero de cualquier longitud formado por moléculas de polidesoxirribonucleótidos (ADN) o de polirribonucleótidos (ARN) o cualquier combinación de las mismas. Dicha definición incluye polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios, lineales o circulares, naturales o sintéticos. Por otra parte, dichos polinucleótidos pueden comprender nucleótidos de procedencia no natural (por ejemplo, nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos como los descritos en las patentes US nº 5.525.711, US nº 4.711.955 o el documento EP-A-302 175), así como modificaciones químicas (por ejemplo, véase el documento WO 92/03568; patente US nº 5.118.672) con el fin de aumentar la estabilidad *in vivo* del ácido nucleico, mejorar la administración del mismo o reducir la velocidad de eliminación en el individuo hospedador. Si existen modificaciones, las mismas se pueden llevar a cabo antes o después de la polimerización.

En la presente memoria, los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos que comprenden 9 o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El polímero puede ser lineal, ramificado o cíclico. En el contexto de la presente invención, un “polipéptido” puede incluir aminoácidos con estereoisomería L (la forma natural) o estereoisomería D, y puede incluir aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural comunes, tales como beta-alanina, ornitina o sulfóxido de metionina, o aminoácidos modificados en uno o más alfa-amino, alfa-carboxilo o cadena lateral, por ejemplo, por adición de un apéndice de metilo, formilo, acetilo, glicosilo, fosforilo y similares. Como indicación general, si el polímero de aminoácidos es largo (por ejemplo, de más de 50 residuos de aminoácidos), se denomina preferentemente polipéptido o proteína. Por consiguiente, “péptido” se refiere a un fragmento de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En el contexto de la presente invención, un péptido comprende preferentemente una región seleccionada de una proteína de origen natural (o nativa), por ejemplo, un fragmento inmunógeno de la misma que contiene un epítipo.

Tal como se define en la presente memoria, el término “polipéptido” incluye polipéptidos nativos y polipéptidos modificados. El término “nativo”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un material obtenido de una fuente natural, a diferencia del material modificado o alterado artificialmente por el hombre en el laboratorio. Por ejemplo, un polipéptido nativo está codificado por un gen que está presente en el genoma de un organismo o célula de tipo natural. En cambio, un polipéptido modificado está codificado por una molécula de ácido nucleico que se ha modificado en el laboratorio con el fin de diferenciarla del polipéptido nativo, por ejemplo por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos, o mediante cualquier combinación de estas posibilidades. Cuando se contemplan diversas modificaciones, las mismas pueden afectar a residuos consecutivos y/o a residuos no consecutivos. Los ejemplos de modificación o modificaciones contempladas en la presente invención pueden dar lugar a la alteración de la actividad biológica mostrada por el polipéptido nativo. Los aminoácidos que son esenciales para una determinada actividad biológica se pueden identificar por métodos rutinarios, tales como análisis estructural y funcional, y el experto en la materia puede determinar fácilmente el tipo de mutación o mutaciones capaces de reducir o eliminar dicha actividad biológica. Este tipo de modificaciones se pueden llevar a cabo por técnicas rutinarias, tales como la mutagénesis dirigida al sitio. Alternativamente, se puede generar una molécula de ácido nucleico sintética que codifica el polipéptido modificado por síntesis química en un proceso automatizado (por ejemplo, ensamblarla a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes, tal como se describe a continuación en el apartado de ejemplos).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “obtenido” se refiere al material encontrado, aislado, purificado o derivado de una fuente natural. “Aislado” significa extraído de su ambiente natural. “Purificado” denota que el material está sustancialmente desprovisto, por lo menos, de otro u otros componentes con los que está asociado de forma natural. “Derivado” denota una o más modificaciones con respecto al material nativo (en particular, mutaciones tales como sustituciones, delecciones y/o inserciones). Las técnicas de aislamiento, purificación y modificación son rutinarias en la técnica y dependen del material que se quiere obtener (por ejemplo, la clonación de una molécula de ácido nucleico se puede llevar a cabo a partir de una fuente natural mediante la utilización de enzimas de restricción, por PCR o por síntesis química).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “homología” se expresa generalmente como porcentaje y se refiere a las secuencias de nucleótidos que conservan un determinado grado de identidad entre sí a lo largo de una porción, por lo menos, de 40 nucleótidos consecutivos (por ejemplo, de aproximadamente 40, 45, 50, 55, 57, 58, 59, 60, 70 o incluso más nucleótidos consecutivos). La expresión “por lo menos el 80%” se refiere a aproximadamente el 80% o más del 80% (por ejemplo, cualquier valor superior al 80%, ventajosamente de por lo menos el 85%, deseablemente por lo menos el 87%, preferentemente, por lo menos, el 90%, más preferentemente, por lo menos, el 95%, aún más preferentemente, por lo menos, el 97% y hasta el 100% de homología de secuencia). La expresión “menos del 75%” se refiere a cualquier valor por debajo del 75%, por ejemplo de aproximadamente el 74%, el 72%, el 70%, el 68%, el 65%, el 62%, el 60% o incluso menos. El porcentaje de homología entre dos secuencias de nucleótidos es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las mismas, teniendo en cuenta el

número de huecos que es necesario introducir para una alineación óptima y la longitud de cada hueco. En la técnica se dispone de diversos programas informáticos y algoritmos matemáticos para determinar los porcentajes de identidad entre secuencias de nucleótidos, como por ejemplo el paquete GCG Wisconsin y el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y descrito en diversas publicaciones (por ejemplo, en Altschul *et al*, 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410).

Como punto de partida, se puede utilizar una alineación de secuencia entre la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico antes de la modificación a fin de revelar la porción o porciones de 40 o más nucleótidos continuos que comparten un porcentaje de homología del 80% o mayor del 80%, es decir, la porción o porciones "homólogas". En una forma de realización particular, el patrón de uso de codones de la primera molécula de ácido nucleico o la segunda molécula de ácido nucleico, o la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico, se modifica (por ejemplo, por degeneración del patrón de uso de codones) por lo menos en dicha porción o porciones homólogas de 40 o más nucleótidos continuos (por ejemplo, aproximadamente 40, 45, 50, 55, 57, 58, 59, 60, 70 o incluso más), a fin de reducir el porcentaje de homología a menos del 75% (por ejemplo, a aproximadamente el 74%, el 72%, el 70%, el 68%, el 65%, el 62%, el 60% o incluso menos).

Aunque los residuos de metionina y triptófano están codificados cada uno por un único triplete de ácido nucleico (es decir, un codón), se pueden utilizar diferentes codones para codificar los otros 18 aminoácidos (degeneración del código genético). Por ejemplo, los aminoácidos están codificados por codones del siguiente modo: la alanina (Ala o A) está codificada por los codones GCA, GCC, GCG y GCU; la cisteína (C o Cys), por los codones UGC y UGU; el ácido aspártico (D o Asp), por los codones GAC y GAU; el ácido glutámico (E o Glu), por los codones GAA y GAG; la fenilalanina (F o Phe), por los codones UUC y UUU; la glicina (G o Gly), por los codones GGA, GGC, GGG y GGU; la histidina (H o His), por los codones CAC y CAU; la isoleucina (I o Ile), por los codones AUA, AUC y AUU; la lisina (K o Lys), por los codones AAA y AAG; la leucina (L o Leu), por los codones UUA, UUG, CUA, CUC, CUG y CUU; la metionina (M o Met) por el codón AUG; la asparagina (N o Asn), por los codones AAC y AAU; la prolina (P o Pro), por los codones CCA, CCC, CCG y CCU; la glutamina (Q o Gln), por los codones CAA y CAG; la arginina (R o Arg), por los codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG y CGU; la serina (S o Ser), por los codones AGC, AGU, UCA, UCC, UCG y UCU; la treonina (T o Thr), por los codones ACA, ACC, ACG y ACU; la valina (V o Val), por los codones GUA, GUC, GUG y GUU; el triptófano (W o Trp) por el codón UGG y la tirosina (Y o Tyr), por los codones UAC y UAU.

La reducción del porcentaje de homología en la porción o porciones homólogas presentes en dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico se puede obtener aprovechando la degeneración del código genético y modificando el patrón de uso de codones en la primera molécula de ácido nucleico y/o la segunda molécula de ácido nucleico. Habitualmente, la modificación del patrón de uso de codones se lleva a cabo mediante la sustitución de uno o más codones "nativos" por otro codón o codones. Por ejemplo, la sustitución del codón AGA, que codifica la Arg, por el codón CGC, que codifica asimismo la Arg, reduce la homología en 2 de las 3 posiciones del codón. No es necesario degenerar todos los codones nativos, ya que la homología se puede reducir de forma suficiente con una sustitución parcial. Por otro lado, la modificación del patrón de uso de codones se puede llevar a cabo a lo largo de toda la molécula de ácido nucleico o se puede limitar a la porción o porciones homólogas presentes antes de la modificación. Deseablemente, en el contexto de la presente invención, la degeneración se lleva a cabo en la primera molécula de ácido nucleico y se limita a la porción o porciones homólogas. Preferentemente, el patrón de uso de codones se modifica en el nivel de los nucleótidos, y las modificaciones son silenciosas en el nivel de los aminoácidos, es decir que, cuando es posible, cada codón "nativo" se sustituye por otro codón que codifica el mismo aminoácido, de tal modo que dichas modificaciones no se traducen en el polipéptido codificado. Más preferentemente, cuando es posible, el patrón de uso de codones se modifica de tal modo que las porciones homólogas entre la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico se limitan a menos de 9 u 8 nucleótidos consecutivos, ventajosamente, a menos de 7 nucleótidos consecutivos, preferentemente, a menos de 6 nucleótidos consecutivos, y más preferentemente, a menos de 5 nucleótidos consecutivos. La modificación del patrón de uso de codones se puede generar de diversas maneras conocidas por el experto en la materia, tal como la mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, mediante el sistema de mutagénesis *in vitro* SculptorTM, de Amersham, Les Ulis, Francia), la mutagénesis por PCR o el barajado de ADN, y por técnicas de síntesis química (por ejemplo, obteniéndose una molécula de ácido nucleico sintética).

Cuando el vector según la presente invención comprende más de dos moléculas de ácido nucleico, cualquier molécula de ácido nucleico comprendida en dicho vector y obtenida a partir de una secuencia de ácido nucleico nativa que presenta un porcentaje de homología de aproximadamente el 80% o mayor del 80% a lo largo de una porción de 40 o más nucleótidos continuos, por lo menos, con respecto a otra secuencia de ácido nucleico nativa de la que se obtiene otra molécula de ácido nucleico, se puede modificar a fin de reducir el porcentaje de homología a menos del 75%, es decir, de tal modo que ningún par de moléculas de ácido nucleico comprendido en el vector pueda comprender una porción de 40 o más nucleótidos consecutivos con un porcentaje de identidad mayor del 75%.

Se puede utilizar una alineación de secuencias entre cada (par de) secuencias nativas de las que se obtienen las moléculas de ácido nucleico con el fin de identificar la porción o porciones que presentan un porcentaje de homología del 80% o mayor del 80%. A continuación se modifica la secuencia de una o más de las secuencias

5 nativas, concretamente degenerando el uso de codones a fin de reducir el porcentaje de homología en las porciones homólogas, como mínimo, a menos del 75%. Al final, ninguna molécula de ácido nucleico comprendida en el vector debería comprender una porción de 40 o más (por ejemplo, de 45, 50, 55, 57, 58, 59, 60, 70, o incluso más) nucleótidos consecutivos con un porcentaje de identidad mayor del 75% con respecto a ninguna otra molécula de ácido nucleico comprendida en dicho vector.

10 Tal como se ha mencionado anteriormente, el polipéptido codificado por las moléculas de ácido nucleico comprendidas en el vector puede tener la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido nativo o no. En particular, además de las mutaciones para degenerar el uso de codones con el fin de reducir la homología, por lo menos, en las porciones homólogas de las moléculas de ácido nucleico comprendidas en el vector, dichas moléculas de ácido nucleico comprendidas en el vector también pueden comprender mutaciones adicionales que dan lugar a una modificación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado o no.

15 El vector según la presente invención comprende vectores tanto víricos como no víricos (por ejemplo, ADN plasmídico). Entre los vectores no víricos adecuados se incluyen plásmidos tales como pREP4, pCEP4 (Invitrogene), pCI (Promega), pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840), pVAX y pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi *et al*, 2002, J. Virol. 76, 12735-12746). En la presente memoria, la expresión "vector vírico" se utiliza de acuerdo con su significado conocido en la técnica. Se refiere a cualquier vector que comprende por lo menos un elemento de origen vírico, incluido un genoma vírico completo, una porción del mismo o un genoma vírico modificado, tal como se describe a continuación, así como partículas víricas generadas a partir de los mismos (por ejemplo, un vector vírico empaquetado en una cápside vírica para producir partículas víricas infecciosas). Los vectores víricos según la presente invención pueden ser competentes para la replicación o se pueden deshabilitar genéticamente para que presenten una replicación deficiente o deteriorada. El término "competente para la replicación", tal como se utiliza en la presente memoria, comprende vectores víricos de replicación selectiva y de replicación condicional que han sido diseñados para replicarse mejor o selectivamente en células hospedadoras específicas (por ejemplo, células tumorales). Los vectores víricos se pueden obtener a partir de diversos virus diferentes, y especialmente de un virus seleccionado de entre el grupo formado por retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), poxvirus, virus del herpes, virus del sarampión y espumavirus.

30 En una forma de realización, el vector según la presente invención es un vector adenovírico (para una visión general, véase "Adenoviral vectors for gene therapy", 2002, Ed D. Curiel y J. Douglas, Academic Press). Se puede derivar de cualquier adenovirus humano o animal. En el contexto de la presente invención, se pueden utilizar cualquier serotipo y cualquier subgrupo. Se pueden citar, más particularmente, el subgrupo A (por ejemplo, los serotipos 12, 18 y 31), el subgrupo B (por ejemplo, los serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34 y 35), el subgrupo C (por ejemplo, los serotipos 1, 2, 5 y 6), el subgrupo D (por ejemplo, los serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39 y 42-47), el subgrupo E (serotipo 4) y el subgrupo F (serotipos 40 y 41). Son particularmente preferentes los adenovirus humanos 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), 11 (Ad11), 24 (Ad24) y 35 (Ad35). Dichos adenovirus están disponibles a través de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) y han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, organización y métodos para producirlos, permitiendo que el especialista los aplique (véase, por ejemplo, las patentes US nº 6.133.028; US nº 6.110.735, los documentos WO 02/40665, WO 00/50573; EP 1 016 711, Vogels *et al*, 2003, J. Virol. 77, 8263-8271).

45 El vector adenovírico según la presente invención puede ser competente para la replicación. Numerosos ejemplos de vectores adenovíricos competentes para la replicación están fácilmente disponibles para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Hernández-Alcoceba *et al*, 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis *et al*, 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany *et al*, 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727; documento WO 00/24408; patente US nº 5.998.205, documento WO 99/25860, patente US nº 5.698.443, documentos WO 00/46355, WO 00/15820 y WO 01/36650).

50 Alternativamente, el vector adenovírico según la presente invención puede ser de replicación deficiente (véase, por ejemplo, el documento WO 94/28152). Los vectores adenovíricos de replicación deficiente preferentes son defectuosos en E1 (por ejemplo, patentes US nº 6.136.594 y US nº 6.013.638), con una delección en E1 que se extiende aproximadamente desde la posición 459 a la posición 3.328, o aproximadamente desde la posición 459 a la posición 3.510 (haciendo referencia a la secuencia del adenovirus humano de tipo 5 que se describe en GenBank bajo el número de acceso M 73260, y en Chroboczek *et al*, 1992, Virol. 186, 280-285). La capacidad de clonación y la seguridad se pueden mejorar adicionalmente mediante la delección de una porción o porciones adicionales del genoma adenovírico (por ejemplo, en la región no esencial E3 o en otras regiones esenciales E2, E4, tal como se describe en Lusky *et al*, 1998, J. Virol 72, 2022-2032).

60 La primera y la segunda moléculas de ácido nucleico se pueden insertar de forma independiente en cualquier lugar del vector adenovírico según la presente invención, tal como se describe en Chartier *et al* (1996, J. Virol. 70, 4805-4810) y posicionarse de forma independiente en orientación sentido y/o antisentido respecto a la dirección transcripcional natural de la región de inserción. Por ejemplo, se pueden insertar las dos en sustitución de la región E1 o, alternativamente, una se inserta en sustitución de la región E1 y la otra en sustitución de la región E3.

65 En otra forma de realización, el vector según la presente invención es un vector poxvírico (véase, por ejemplo, Cox

- et al* in "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press). Se puede obtener de cualquier miembro de la familia de los poxvirus, en particular el virus de la viruela del canario (por ejemplo, el vector ALVAC tal como se describe en el documento WO 95/27780), la viruela aviar (por ejemplo, el vector TROVAC tal como se describe en Paoletti *et al*, 1995, Dev. Biol. Stand. 84, 159-163) o el virus de la vaccinia, siendo preferente este último. Se puede seleccionar un virus de la vaccinia adecuado entre el grupo formado por la cepa Copenhague (Goebel *et al*, 1990, Virol. 179, 247-266 y 517-563; Johnson *et al*, 1993, Virol. 196, 381-401), la cepa Wyeth, la cepa NYVAC (véase WO 92/15672 and Tartaglia *et al*, 1992, Virology 188, 217-232) y la cepa Ankara modificada (MVA) altamente atenuada (Mayr *et al*, 1975, Infection 3, 6-16). Dichos vectores y métodos de producción de los mismos se describen en numerosos documentos accesibles para el experto en la materia (por ejemplo, Paul *et al*, 2002, Cancer gene Ther. 9, 470-477; Piccini *et al*, 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563; patentes US nº 4.769.330; US nº 4.772.848; US nº 4.603.112; US nº 5.100.587 y US nº 5.179.993). La primera y la segunda moléculas de ácido nucleico que se utilizan en la presente invención se insertan preferentemente en un locus no esencial del genoma del poxvirus con el fin de que el poxvirus recombinante se mantenga viable e infeccioso. Las regiones no esenciales son regiones intergénicas no codificantes o cualquier gen para el que la inactivación o la delección no perjudique significativamente el crecimiento, la replicación o la infección del virus. También se puede contemplar la inserción en un locus vírico esencial, siempre y cuando la función defectuosa se suministre *en trans* durante la producción de las partículas víricas, por ejemplo utilizando una línea celular auxiliar que transporta las secuencias complementarias correspondientes a las suprimidas en el genoma poxvírico.
- 20 Cuando se utiliza el virus de la vaccinia de la cepa Copenhague, las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico se insertan preferentemente en el gen de la timidina cinasa (tk) (Hruby *et al*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411-3415; Weir *et al*, 1983, J. Virol. 46, 530-537). Sin embargo, también resultan apropiados otros sitios de inserción, por ejemplo, en el gen de la hemaglutinina (Guo *et al*, 1989, J. Virol. 63, 4189-4198), en el locus K1L, en el gen u (Zhou *et al*, 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190) o en el extremo izquierdo del genoma del virus de la vaccinia, en el que, según la bibliografía, se han documentado diversas delecciones espontáneas o diseñadas. (Altenburger *et al*, 1989, Archives Virol. 105, 15-27; Moss *et al* 1981, J. Virol. 40, 387-395; Panicali *et al*, 1981, J. Virol. 37, 1000-1010; Perkus *et al*, 1989, J. Virol. 63, 3829-3836; Perkus *et al*, 1990, Virol. 179, 276-286; Perkus *et al*, 1991, Virol. 180, 406-410).
- 30 Cuando se utiliza el MVA, las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico se pueden insertar de forma independiente en cualquiera de las delecciones identificadas I a VII que se han producido en el genoma del MVA (Antoine *et al*, 1998, Virology 244, 365-396), así como en el locus D4R, pero resulta preferente la inserción en la delección II y/o III (Meyer *et al*, 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038; Sutter *et al*, 1994, Vaccine 12, 1032-1040).
- 35 Cuando se utiliza el virus de la viruela aviar, aunque se puede contemplar la inserción dentro del gen de la timidina cinasa, las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico se introducen preferentemente en la región intergénica situada entre los ORF 7 y 9 (véase, por ejemplo, el documento EP 314 569 y la patente US nº 5.180.675).
- 40 En otra forma de realización de la presente invención, las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico codifican independientemente un polipéptido capaz de proporcionar una actividad terapéutica o protectora en un individuo que padece o es susceptible de padecer un estado patológico. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "individuo" se refiere a un vertebrado, particularmente un miembro de las especies de mamíferos y especialmente animales domésticos, animales de granja, animales para la práctica del deporte y primates, incluidos los seres humanos. Un polipéptido de este tipo se selecciona preferentemente de entre el grupo formado por polipéptidos inmunógenos y polipéptidos antitumorales.
- 45 El término polipéptido "inmunógeno" se refiere a un polipéptido capaz de inducir, estimular, desarrollar o potenciar una respuesta inmunitaria en un individuo en el que se expresa. Dicha respuesta inmunitaria puede ser humoral o celular, o a la vez humoral y celular. La respuesta humoral desencadena la producción de anticuerpos contra el polipéptido en cuestión, mientras que la respuesta celular desencadena una respuesta de los linfocitos T auxiliares y/o los CTL, y/o estimula la producción de citocinas. Normalmente, la propiedad inmunógena de un polipéptido se puede evaluar *in vitro* o *in vivo* mediante diversos ensayos estándares en la técnica (para una descripción general de las técnicas disponibles para evaluar la aparición y la activación de una respuesta inmunitaria, véase, por ejemplo, la última edición de Coligan *et al*, Current Protocols in Immunology; ed J. Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Por ejemplo, la detección puede ser colorimétrica, fluorométrica o radiactiva, y entre las técnicas adecuadas se incluyen la ELISA, la transferencia Western, radioinmunoensayos y ensayos de inmunoprecipitación. La medición de la inmunidad celular se puede llevar a cabo mediante la medición de los perfiles de citocinas secretadas por las células efectoras activadas, incluidas las derivadas de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (por ejemplo, cuantificación de células productoras de IFN γ por ELISPOT), mediante la determinación del estado de activación de las células inmunitarias efectoras (por ejemplo, ensayos de proliferación de linfocitos T por una absorción de ^3H -timidina clásica), mediante el ensayo de linfocitos T específicos de antígeno en un individuo sensibilizado (por ejemplo, lisis específica de péptido en un ensayo de citotoxicidad). La propiedad inmunógena de un polipéptido también se puede evaluar en modelos animales adecuados por ELISPOT, técnicas analíticas basadas en tetrámeros u otras técnicas estándar para el análisis de la inmunidad mediada por linfocitos T. Se pueden obtener polipéptidos inmunógenos adecuados a partir del virus de la hepatitis B (VHB) (por ejemplo, polipéptidos S, preS2 o preS1, tal como se

describe en los documentos EP 414 374; EP 304 578 o EP 198 474); virus de la hepatitis C (VHC) (por ejemplo, núcleo (C), la glucoproteína de envoltura E1, E2, el polipéptido no estructural NS2, NS3, NS4 o NS5, o cualquier combinación de los mismos); virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (por ejemplo, gp120 o gp160), y virus del papiloma (tal como se ilustra a continuación).

5 La expresión polipéptido “antitumoral” se refiere a un polipéptido capaz de proporcionar la eliminación o una reducción neta de la expansión de las células tumorales. La propiedad antitumoral de un polipéptido se puede determinar en modelos animales adecuados o en el individuo tratado por una disminución del tamaño real del tumor a lo largo de un período de tiempo. Se pueden utilizar diversos métodos para estimar el tamaño del tumor, incluidos
10 métodos radiológicos (por ejemplo, tomografía computarizada por emisión de fotones individuales y positrones; véase de forma general “Nuclear Medicine in Clinical Oncology”, Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, Nueva York, 1986), métodos que emplean reactivos convencionales de técnicas de imagen (por ejemplo, el citrato de galio-67), métodos inmunológicos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales radiomarcados dirigidos a marcadores tumorales específicos), así como métodos por ultrasonidos (véase “Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors”, Kossoff y Fukuda, (eds.); Igaku-Shoin, Nueva York, 1984). Alternativamente, la propiedad antitumoral de un polipéptido se puede determinar sobre la base de una disminución de la presencia de un marcador tumoral. Entre los ejemplos se incluyen el PSA para la detección del cáncer de próstata y el CEA para la detección del cáncer colorrectal y determinados cánceres de mama. Además, la propiedad antitumoral de un polipéptido se puede determinar en un modelo animal adecuado, por ejemplo, utilizando ratones inyectados con una línea celular cancerosa humana representativa. Tras haber aparecido tumores palpables, el vector según la presente invención se inyecta en los ratones y se controla la reducción de la tasa de crecimiento tumoral y el aumento de la supervivencia. Además, se pueden utilizar diversos métodos *in vitro* para predecir la inhibición tumoral *in vivo*. Entre los polipéptidos antitumorales adecuados se incluyen antígenos asociados a tumores (TAA), tales como MUC-1 (documento WO 92/07000; Acres *et al*, 2005, Exp. Rev. Vaccines 4(4)), BRCA-1, BRCA-2 (Palma *et al*, 2006, Critical Reviews in Oncology/haematology 27, 1-23), el antígeno carcinoembrionario CEA (Conroy *et al*, 1995, Gene Ther; 2, 59-65), MAGE (WO 99/4018 De Plaen *et al*, 1994, Immunogenetics 40, 360-369), MART-1, gp 100 (Bakker *et al*, 1994, J. Exp. Med. 179, 1005-9), PRAME, BAGE, Lage (también conocido como NY Eos 1) SAGE, HAGE (documento WO 99/53061), GAGE (Robbins y Kawakami, 1996. Current Opinions in Immunol. 8, 628-36) y el antígeno específico de la próstata (PSA) (Ferguson *et al*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 3114-9; documentos WO 98/12302, WO 98/20117 y WO 00/04149) así como polipéptidos víricos procedentes de virus con potencial inductor de tumores (por ejemplo, el virus del papiloma).

En otra forma de realización de la presente invención, las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico se obtienen del mismo organismo o de organismos estrechamente relacionados.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “organismo” incluye microorganismos que tienen preferentemente potencial patógeno, así como eucariotas superiores. El término “microorganismo” se refiere a hongos, bacterias, protozoos y virus. Entre los ejemplos representativos de virus se incluyen, sin limitación, el VIH (VIH-1 o VIH-2), los virus del herpes humano (por ejemplo, VHS-1 o VHS-2), el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein Barr (VEB), el virus de la hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis A (VHA), VHB, VHC y virus de la hepatitis E), flavivirus (por ejemplo, el virus de la fiebre amarilla), el virus varicela zóster (VVZ), el paramixovirus, el virus sincitial respiratorio, los virus paragripales, el virus del sarampión, los virus de la gripe y los virus del papiloma (tal como se han definido anteriormente). Entre los ejemplos representativos de bacterias adecuadas se incluyen, sin limitación, *Neisseria* (por ejemplo, *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis*); *Bordetella* (por ejemplo, *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*), micobacterias (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*); legionela (por ejemplo, *L. pneumophila*); *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli* enterotóxica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena); *Shigella* (por ejemplo, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*); salmonela (por ejemplo, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*); listeria (por ejemplo, *L. monocytogenes*); *Helicobacter* (por ejemplo, *H. pylori*); pseudomonas (por ejemplo, *P. aeruginosa*); estafilococos (por ejemplo, *S. aureus*, *S. epidermidis*); enterococos (por ejemplo, *E. faecalis*, *E. faecium*); bacilos (por ejemplo, *B. anthracis*); *Corynebacterium* (por ejemplo, *C. diphtheriae*) y clamidias (por ejemplo, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*). Entre los ejemplos representativos de parásitos se incluyen, sin limitación, *Plasmodium* (por ejemplo, *P. falciparum*); *Toxoplasma* (por ejemplo, *T. gondii*); *Leshmania* (por ejemplo, *L. major*); *Pneumocystis* (por ejemplo, *P. carinii*); y *Schistosoma* (por ejemplo, *S. mansoni*). Entre los ejemplos representativos de hongos se incluyen, sin limitación, *Candida* (por ejemplo, *C. albicans*) y *Aspergillus*. Los eucariotas superiores son preferentemente mamíferos, incluidos los seres humanos.

La expresión “mismo organismo” define los organismos originados a partir de un antepasado común y que han seguido la misma ruta evolutiva. Entre los ejemplos representativos se incluyen diversas cepas de virus con el mismo serotipo o genotipo. Por ejemplo, dos cepas del VPH-16 se clasifican dentro de esta categoría. La expresión “organismos estrechamente relacionados” define organismos originados a partir de un antepasado común pero que se han diferenciado durante la evolución. Entre los ejemplos representativos se incluyen virus con diferentes serotipos o genotipos. Por ejemplo, el VPH-16 y el VPH-18 se clasifican dentro de esta categoría.

65 En una forma de realización preferente, el organismo para el que se obtienen las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico es un virus del papiloma y cada una de ellas codifica un polipéptido del virus del

papiloma. Un “virus del papiloma” se puede definir como un virus que pertenece a la subfamilia *Papillomaviridae*, y el término incluye virus del papiloma animal de origen en especies no humanas, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, ganado, caballos, conejos, ovejas, perros, primates no humanos y roedores, y el virus del papiloma humano (VPH). Hasta el momento se han identificado más de 100 genotipos de VPH (Van Ranst *et al*, 1992, J. Gen. Virol. 73, 2653; De Villiers *et al*, 2004, Virology 324, 17-27) que se han clasificado en serotipos de “bajo riesgo” (LR) y de “alto riesgo” (HR) en función de su potencial oncogénico. Los VPH LR causan tumores benignos en los individuos infectados, mientras que los HR suponen un riesgo elevado de progresión maligna.

Como orientación general, los virus del papiloma poseen un ADN circular bicatenario, de aproximadamente 7.900 pares de bases, rodeado por una cápside proteínica (véase, por ejemplo, Pfister, 1987, en *The papovaviridae: The Papillomaviruses*, Salzman y Howley, eds., Plenum Press, Nueva York, p 1-38). Su genoma está formado por tres regiones funcionales, la región temprana (E), la región tardía (L) y la región larga de control (LCR). La LCR contiene secuencias reguladoras de la transcripción, como potenciadores y promotores. La región tardía codifica las proteínas estructurales L1 y L2, respectivamente, las proteínas de la cápside principales y secundarias, mientras que la región temprana codifica proteínas reguladoras (E1-E7) que se encuentran predominantemente en el núcleo y que controlan la replicación vírica, la transcripción y la transformación celular. Más específicamente, la proteína E1 es una fosfoproteína de unión a ADN con actividad helicasa dependiente de ATP (Desaintes y Demeret, 1996, *Semin. Cancer Biol.* 7, 339-347; Wilson *et al*, 2002, *Virus Gene* 24, 275-290). La proteína E2 es una fosfoproteína de unión a ADN multifuncional que regula la transcripción génica vírica y controla la replicación del ADN (Bechtold *et al*, 2003, *J. Virol.* 77, 2021-8). La proteína codificada por E4 se une a los filamentos de queratina del citoplasma y desempeña un papel en la maduración vírica. La función de la proteína E5 sigue siendo motivo de controversia, y su expresión se pierde a menudo durante la integración vírica en los cromosomas del hospedador. Los productos génicos codificados por E6 y E7 de los genotipos HR del VPH participan en la transformación oncogénica de las células infectadas (Kanda *et al*, 1988, *J. Virol.* 62, 610-3; Vousden *et al*, 1988, *Oncogene Res.* 3, 1-9; Bedell *et al*, 1987, *J. Virol.* 61, 3635-40), presumiblemente a través de la unión de estas proteínas víricas a los productos génicos p53 supresores de tumores y al retinoblastoma (Rb), respectivamente (descrito en Howley, 1996, *Papillomaviruses and their replication*, p 2045-2076. En B.N. Fields, D.M. Knipe y P.M. Howley (ed.), *Virology*, 3ª ed., Lippincott-Raven Press, Nueva York). Los residuos de aminoácidos implicados en la unión del polipéptido nativo E6 del VPH-16 a p53 se han definido claramente como los comprendidos entre el residuo 118 y el residuo 122 (siendo +1 el primer residuo de Met, o del residuo 111 al residuo 115 si se empieza por el segundo residuo de Met, utilizado preferentemente) (Crook *et al*, 1991, *Cell* 67, 547-556) y los implicados en la unión del polipéptido nativo E7 del VPH-16 al Rb se sitúan entre el residuo 21 y el residuo 26 (Munger *et al*, 1989, *EMBO J.* 8, 4099-4105; Heck *et al*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4442-4446).

Preferentemente, las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico se obtienen de forma independiente a partir de un virus del papiloma de alto riesgo seleccionado entre el grupo formado por VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68, VPH-70 y VPH-85.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “polipéptido del virus del papiloma” se refiere a un polipéptido reconocido en la técnica codificado por una molécula de ácido nucleico obtenida a partir de un genoma/fuente del virus del papiloma. Tal como se ha definido anteriormente en relación con el término “polipéptido”, la expresión “polipéptido del virus del papiloma” incluye polipéptidos del virus del papiloma nativos y modificados y péptidos de los mismos. Entre las fuentes de virus del papiloma se incluyen, sin limitación, muestras biológicas (por ejemplo, secciones de tejido, muestras de biopsia y cultivos de tejidos extraídos de un individuo expuesto a un virus del papiloma), células cultivadas (por ejemplo, células CaSki, disponibles a través de la ATCC), así como materiales recombinantes disponibles en instituciones de depósito, en catálogos comerciales o descritos en la bibliografía. Las secuencias de nucleótidos de diversos genomas del virus del papiloma y las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados se han descrito en la bibliografía y están disponibles en los bancos de datos especializados, por ejemplo, GenBank. Para información general, el genoma de VPH-16 está descrito en GenBank con los números de entrada NC_01526 y K02718; el de VPH-18, con los números NC_001357 y X05015; el de VPH-31, con el número J04353; el de VPH-33, con el número M12732; el de VPH-35, con el número NC_001529; el de VPH-39, con el número NC_001535; el de VPH-45, con el número X74479; el de VPH-51, con el número NC_001533; el de VPH-52, con el número NC_001592; el de VPH-56, con el número X74483; el de VPH-58, con el número D90400; el de VPH-59, con el número NC_001635; el de VPH-68, con los números X67160 y M73258; el de VPH-70, con el número U21941; y el de VPH-85, con el número AF131950.

El polipéptido o polipéptidos del virus del papiloma codificados por la primera y/o la segunda moléculas de ácido nucleico puede ser temprano, tardío o cualquier combinación de los mismos. Entre los polipéptidos tempranos del virus del papiloma se incluyen E1, E2, E4, E5, E6 y E7, mientras que los polipéptidos tardíos pueden ser L1 o L2. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los polipéptidos tempranos y tardíos de un gran número de serotipos de virus del papiloma se describen en la bibliografía disponible para el experto en la materia.

De forma deseable, las por lo menos primera y segunda moléculas de ácido nucleico codifican independientemente un polipéptido temprano seleccionado entre el grupo formado por E1, E2, E6 y E7. A título ilustrativo, las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos E1, E2, E6 y E7 nativos de VPH-16 se indican, respectivamente, en las SEC ID

nº: 1-4. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas secuencias ilustrativas. De hecho, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos pueden variar entre diferentes cepas del virus del papiloma, y esta variación genética natural se incluye dentro del alcance de la presente invención, así como la modificación o modificaciones no naturales, como las descritas a continuación. A continuación se indican ejemplos ilustrativos de polipéptidos modificados del virus del papiloma adecuados (por ejemplo, en las SEC ID nº: 5-8 y 64-65). Sin embargo, el experto en la materia podrá adaptar las modificaciones descritas en la presente memoria (por ejemplo, para polipéptidos procedentes de otros genotipos del virus del papiloma por comparación de secuencias).

Entre los polipéptidos E1 del virus del papiloma adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen mutantes defectuosos en cuanto a la estimulación de la replicación vírica, es decir, cuya capacidad para estimular la replicación vírica es significativamente menor desde el punto de vista estadístico que la del correspondiente polipéptido E1 nativo (por ejemplo, de menos del 75%, ventajosamente menos del 50%, preferentemente menos del 10% y más preferentemente menos del 5%). Como orientación general, el dominio responsable de la estimulación de la replicación vírica se encuentra en la parte central de E1 (por ejemplo, Hugues y Romanos, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21, 5817-23). En la bibliografía disponible para el experto en la materia se describen ejemplos representativos de polipéptidos E1 de replicación deficiente, por ejemplo, en Yasugi *et al* (1997, *J. Virol* 71, 5942-51). Una modificación preferente en el contexto de la presente invención incluye la sustitución del residuo de Gly de la posición 482 del polipéptido E1 de VPH-16 por otro residuo (preferentemente, un residuo de Asp) (por ejemplo, véase la SEC ID nº: 5) o la sustitución del residuo de Gly de la posición 489 del polipéptido E1 de VPH-18 por otro residuo (preferentemente, un residuo de Asp) (por ejemplo, véase la SEC ID nº: 6).

Entre los polipéptidos E2 adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen mutantes deficientes en cuanto a la activación transcripcional y/o las actividades de replicación en comparación con el polipéptido E2 nativo (por ejemplo, menor en un 75%, ventajosamente menor en un 50%, preferentemente menor en un 10% y más preferentemente menor en un 5%). Como orientación general, el dominio responsable de la activación transcripcional y la estimulación de la replicación se encuentra en la porción N-terminal de E2 (Seedorf *et al*, 1985, *Virology*, 145,181-185; Kennedy *et al*, 1991, *J. Virol.* 65, 2093-2097; Cole *et al*, 1987, *J. Mol. Biol.* 193, 599-608; McBride *et al*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 510-514) y la reducción o falta de replicación y actividades transcripcionales de E2 se pueden determinar fácilmente mediante métodos estándar (véase, por ejemplo, Sakai *et al*, 1996, *J. Virol.* 70, 1602-1611). En la bibliografía disponible para el experto en la materia se describen mutantes de E2 defectuosos adecuados para su utilización en la presente invención, por ejemplo, en Demeret *et al* (1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 4777-4784), Sakai *et al* (1996, *J. Virol.* 70, 1602-1611), Brokaw *et al* (1996, *J. Virology* 70, 23-29) y Ferguson *et al* (1996, *J. Virology* 70, 4193-4199). Entre las modificaciones preferentes en el contexto de la presente invención se incluyen la sustitución del residuo de Glu de la posición 39 del E2 de VPH-16, preferentemente por un residuo de Ala (E39A) y/o la sustitución del residuo de Ile de la posición 73, preferentemente por un residuo de Ala (I73A) (por ejemplo, véase la SEC ID nº: 7). A título ilustrativo, los residuos de Glu e Ile de las posiciones 39 y 73 del E2 de VPH-16 corresponden, respectivamente, a los residuos de Glu e Ile de las posiciones 43 y 77 de E2 de VPH-18 (por ejemplo, véase la SEC ID nº: 8).

Los polipéptidos E6 adecuados para su utilización en la presente invención incluyen mutantes no oncogénicos defectuosos en cuanto a la unión al producto génico celular supresor de tumores p53. Se describen ejemplos representativos de polipéptidos E6 no oncogénicos, por ejemplo, en Pim *et al* (1994, *Oncogene* 9, 1869-1876), y Crook *et al* (1991, *Cell* 67, 547-556). En este contexto, entre las modificaciones preferentes se incluyen la delección en el E6 de VPH-16 de los residuos 118 a 122 (CPEEK) (por ejemplo, véase la SEC ID nº: 64) o la delección en el E6 de VPH-18 de los residuos 113 a 117 (NPAEK).

Entre los polipéptidos E7 adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen mutantes no oncogénicos defectuosos en cuanto a la unión al producto génico celular supresor de tumores Rb. Se describen ejemplos representativos de polipéptidos E7 no oncogénicos, por ejemplo, en Munger *et al* (1989, *EMBO J.* 8, 4099-4105), Heck *et al* (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4442-4446) y Phelps *et al* (1992, *J. Virol.* 66, 2148-2427). En este contexto, entre las modificaciones preferentes se incluyen la delección en el E7 de VPH-16 de los residuos 21 a 26 (DLYCYE) (por ejemplo, véase la SEC ID nº: 65) o la delección en el E7 de VPH-18 de los residuos 24 a 28 (DLLCH).

Por otra parte, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos del virus del papiloma) codificados por las por lo menos primera y/o segunda moléculas de ácido nucleico pueden comprender, además, modificaciones adicionales beneficiosas para el procesamiento, la estabilidad y/o la solubilidad de los polipéptidos codificados, por ejemplo, la supresión de uno o más sitios de escisión potenciales, la supresión de uno o más sitios de glucosilación potenciales y/o la presentación en la superficie de las células expresas. Por ejemplo, el polipéptido o polipéptidos codificados pueden incluir señales adecuadas para anclarse dentro de la membrana plasmática de las células expresas. De hecho, se ha puesto de manifiesto con antelación que la presentación membranaria permite mejorar la presentación a través del MHC de clase I y/o MHC de clase II, lo que conlleva una mejora del reconocimiento por parte del sistema inmunitario del hospedador (véase, por ejemplo, el documento WO 99/0388). Dado que los polipéptidos nativos tempranos del virus del papiloma (E1, E2, E6 y E7) son proteínas nucleares (aunque no se ha podido identificar con claridad ninguna señal típica de localización nuclear), podría resultar beneficioso actuar sobre ellos en la membrana plasmática con el fin de mejorar su potencial inmunógeno y, de este modo, su eficacia terapéutica en

el individuo hospedador.

La presentación membranaria eficaz de un polipéptido en la superficie de la célula hospedadora expresora se puede alcanzar mediante la fusión del polipéptido a un péptido señal y un péptido de anclaje a la membrana. Dichos péptidos son conocidos en la técnica. En resumen, habitualmente los péptidos señal están presentes en el extremo N-terminal de polipéptidos de presentación membranaria o secretados, e inician su paso hacia el retículo endoplasmático (ER). Comprenden de 15 a 35 aminoácidos esencialmente hidrófobos que a continuación son eliminados por una endopeptidasa específica situada en el ER para dar el polipéptido maduro. Normalmente, los péptidos de anclaje a la membrana tienen una naturaleza muy hidrófoba y sirven para anclar los polipéptidos en la membrana celular (véase, por ejemplo, Branden y Tooze, 1991, en Introduction to Protein Structure, pág. 202-214, NY Garland). La elección de los péptidos señal y de anclaje a la membrana que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención es amplia. Se pueden obtener de forma independiente a partir de cualquier polipéptido secretado o anclado a la membrana (por ejemplo, polipéptidos celulares o víricos), tal como la glucoproteína de la rabia, la glucoproteína de envoltura del virus VIH o la proteína F del virus del sarampión, o pueden ser sintéticos. El sitio de inserción preferente del péptido señal es el extremo N posterior al codón de iniciación de la traducción, y el del péptido de anclaje a la membrana es el extremo C, por ejemplo inmediatamente anterior al codón de parada. Si es necesario, se puede utilizar un péptido conector para conectar el péptido señal y/o el péptido de anclaje a la membrana con el polipéptido codificado.

Se indican ejemplos representativos de polipéptidos E1 anclados a la membrana y defectuosos adecuados para su utilización en la presente invención en la SEC ID nº: 5 (que define el polipéptido SS-E1*-TMR de VPH-16 que se ilustra en el apartado de ejemplos) y en la SEC ID nº: 6 (que define el polipéptido SS-E1*-TMF de VPH-18 que se ilustra en el apartado de ejemplos). Se indican ejemplos representativos de polipéptidos E2 anclados a la membrana y defectuosos adecuados para su utilización en la presente invención en la SEC ID nº: 7 (que define el polipéptido SS-E2*-TMR de VPH-16 que se ilustra en el apartado de ejemplos) y en la SEC ID nº: 8 (que define el polipéptido SS-E2*-TMR de VPH-18 que se ilustra en el apartado de ejemplos). Se indican ejemplos representativos de polipéptidos E6 y E7 anclados a la membrana y no oncogénicos adecuados para su utilización en la presente invención, respectivamente, en la SEC ID nº: 64 (que define el polipéptido SS-E6*-TMF de VPH-16 que se ilustra en el apartado de ejemplos) y en la SEC ID nº: 65 (que define el polipéptido SS-E7*-TMR de VPH-16 que se ilustra en el apartado de ejemplos).

En una forma de realización particularmente preferente, las por lo menos primera molécula de ácido nucleico y segunda molécula de ácido nucleico codifican dos polipéptidos del virus del papiloma diferentes obtenidos a partir del mismo serotipo de VPH.

En un aspecto preferente de esta forma de realización, la primera molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido E1 y la segunda molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido E2, o viceversa. Deseablemente, las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos E1 y E2 se obtienen a partir de VPH-16 o VPH-18. Preferentemente, la primera molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº: 5, o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma, y la segunda molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº: 7, o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma. Alternativamente, la primera molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº: 6, o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma, y la segunda molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº: 8, o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma.

En el contexto nativo (por ejemplo, el genoma de VPH-16 o VPH-18), la porción 3' de la secuencia que codifica el polipéptido E1 se solapa con la porción 5' de la secuencia que codifica el polipéptido E2 a lo largo de 59 nucleótidos. Se prevé que la presencia de estos 59 nucleótidos 100% homólogos afecte negativamente a la estabilidad de un vector que expresa las dos moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos E1 y E2. Entre estas porciones comunes puede tener lugar una recombinación homóloga que dé lugar a la pérdida de las secuencias de nucleótidos comprendidas entre ellas.

Según la presente invención, la homología del 100% entre la porción solapante de 59 nucleótidos presente antes de la modificación de las moléculas de ácido nucleico que codifican E1 y E2 se puede reducir a menos del 75% degenerando el patrón de uso de codones en una de las moléculas de ácido nucleico. Un ejemplo representativo de las secuencias degeneradas se indica en la SEC ID nº: 9, en la que la homología de los 59 nucleótidos solapantes de E1/E2 se reduce al 69% (tal como se ilustra en la figura 1), y un vector preferente según la presente invención que codifica los polipéptidos E1 y E2 de VPH-16 comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID nº: 9. La misma estrategia se puede aplicar a la porción solapante presente en las secuencias que codifican los polipéptidos E1 y E2 de VPH-18. Dichas secuencias degeneradas se pueden introducir en la primera molécula de ácido nucleico que codifica E1 en sustitución de los 59 nucleótidos solapantes nativos (por ejemplo, SEC ID nº: 10 y 11, respectivamente).

Por consiguiente, un vector preferente según la presente invención comprende una primera molécula de ácido

nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 10 (que codifica el polipéptido E1 de VPH-16 de la SEC ID n°: 5), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma, y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 12 (que codifica el polipéptido E2 de VPH-16 de la SEC ID n°: 7), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma. Otro vector preferente según la presente invención comprende una primera molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 11 (que codifica el polipéptido E1 de VPH-18 de la SEC ID n°: 6), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma, y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 13 (que codifica el polipéptido E2 de VPH-18 de la SEC ID n°: 8), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma. Más preferentemente, el vector según la presente invención es un vector de MVA, la primera molécula de ácido nucleico (que codifica el polipéptido E1) se coloca bajo el control del promotor 7.5K del virus de la vaccinia y la segunda molécula de ácido nucleico (que codifica el polipéptido E2) se coloca bajo el control del promotor H5R del virus de la vaccinia, y la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico están insertadas en la delección III de dicho vector de MVA.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E1 de VPH-16, una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-16, una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E1 de VPH-18 y una cuarta molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-18, en el que dichas primera, segunda, tercera y cuarta moléculas de ácido nucleico no comprenden ninguna porción de 40 o más nucleótidos continuos con un porcentaje de homología del 75% o mayor del 75%. Preferentemente, dicho polipéptido E1 de VPH-16 comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 5, dicho polipéptido E2 de VPH-16 comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 7, dicho polipéptido E1 de VPH-18 comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 6, y/o dicho polipéptido E2 de VPH-18 comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 8.

En el contexto nativo, las secuencias que codifican el E1 de VPH-16 y VPH-18 comprenden diversas porciones de 40 o más nucleótidos continuos que presentan un porcentaje de homología del 80% o mayor del 80%. Lo mismo es cierto para las secuencias que codifican el E2 de VPH-16 y VPH-18. Por otra parte, las secuencias adyacentes que codifican los polipéptidos E1 y E2 se superponen a lo largo de una porción de aproximadamente 59 nucleótidos en los genomas de VPH-16 y VPH-18. En este contexto, es recomendable modificar las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos E1 y E2 de VPH-18 con el fin de reducir la homología con sus equivalentes de VPH-16 a menos del 75%, especialmente en las porciones homólogas compartidas por los dos serotipos. Con este propósito, las secuencias de nucleótidos de los genes de E1 y E2 de VPH-16 y VPH-18 se pueden alinear y se pueden diseñar modificaciones en el nivel de los nucleótidos a fin de reducir la homología a menos de 8, 7, 6 o, preferentemente, 5 nucleótidos consecutivos. Por otra parte, la secuencia de E1 de VPH-18 se puede modificar adicionalmente para reducir la homología a menos del 75% con la porción de 59 nucleótidos que se solapa con el extremo 5' de la secuencia de E2 de VPH-18. Preferentemente se modifica el uso de codones, pero las modificaciones no se traducen en el nivel de los aminoácidos excepto para generar modificaciones tal como se definen en la presente memoria, por ejemplo, dando lugar a funciones enzimáticas deficientes. Se indican ejemplos representativos de secuencias "degeneradas" de nucleótidos que codifican el E1 de VPH-18 y el E2 de VPH-18 que se pueden utilizar adecuadamente como tercera y cuarta moléculas de ácido nucleico en SEC ID n°: 11 y SEC ID n°: 13, respectivamente. Un vector preferente según la presente invención comprende una primera molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 10 (que codifica el polipéptido E1 de VPH-16 de la SEC ID n°: 5), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma, una segunda molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 12 (que codifica el polipéptido E2 de VPH-16 de la SEC ID n°: 7), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma, una tercera molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 11 (que codifica el polipéptido E1 de VPH-18 de la SEC ID n°: 6), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma, y una cuarta molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 13 (que codifica el polipéptido E2 de VPH-18 de la SEC ID n°: 8), o que consiste esencialmente en la misma, o que consiste en la misma. Preferentemente, el vector es un vector de MVA, la primera, la segunda, la tercera y la cuarta moléculas de ácido nucleico se introducen en la delección III del vector de MVA, la primera y tercera moléculas de ácido nucleico (que codifican el E1) se disponen en orientación opuesta, cada una de ellas bajo el control del promotor p7.5K del virus de la vaccinia, y la segunda y cuarta moléculas de ácido nucleico (que codifican el E2) se disponen en orientación opuesta, cada una de ellas bajo el control del promotor pH5R del virus de la vaccinia.

En otra forma de realización particularmente preferente, las por lo menos primera molécula de ácido nucleico y segunda molécula de ácido nucleico codifican el mismo polipéptido obtenido a partir de organismos estrechamente relacionados, por ejemplo, serotipos de VPH estrechamente relacionadas, como VPH-16, VPH-18, VPH-33 y/o VPH-52.

En un primer aspecto de esta forma de realización, el mismo polipéptido obtenido a partir de organismos estrechamente relacionados es preferentemente un polipéptido E2. Los polipéptidos E2 codificados se modifican preferentemente de modo que se anclan a la membrana y sean defectuosos para la replicación vírica, tal como se

define en la presente memoria. En el contexto nativo, las secuencias de diversos genotipos que codifican el E2 presentan un elevado grado de homología en el nivel de los nucleótidos, especialmente en las porciones más conservadas. Se espera que la presencia de estas secuencias homólogas afecte negativamente a la estabilidad de un vector que coexpresa dos o más (por ejemplo, 3, 4 o incluso más) genes de E2, por ejemplo, los genes de E2 de VPH HR, tales como VPH-16, VPH-18, VPH-33 y VPH-52. Entre estas secuencias génicas homólogas puede tener lugar una recombinación homóloga que provoque la pérdida de las secuencias de nucleótidos comprendidas entre ellas, y por lo tanto la extinción de genes.

Según la presente invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos E2 comprendidas en el vector según la presente invención se pueden modificar degenerando el patrón de uso de codones a fin de reducir la homología a menos del 75%, especialmente en las porciones altamente homólogas. En la SEC ID n°: 13, 66, 67, 68 y 69 se proporcionan ejemplos representativos de moléculas de ácido nucleico degeneradas que codifican los polipéptidos E2. Más específicamente, la SEC ID n°: 13 codifica el polipéptido E2 de VPH-18 de presentación membranaria y de replicación deficiente cuya secuencia de nucleótidos se ha diseñado con el fin de reducir a menos de 8 o 7 nucleótidos consecutivos la homología con sus equivalentes que codifican el polipéptido E2. Las SEC ID n°: 66 y 67 codifican un polipéptido E2 de VPH-33 de replicación deficiente (que es además de presentación membranaria en la SEC ID n°: 67) cuyas secuencias de nucleótidos se han diseñado con el fin de reducir a menos de 8 o 7 nucleótidos consecutivos la homología con los otros equivalentes que codifican el E2. Las SEC ID n°: 68 y 69 codifican un polipéptido E2 de VPH-52 de replicación deficiente (que es además de presentación membranaria en la SEC ID n°: 69) cuyas secuencias de nucleótidos se han diseñado con el fin de reducir la homología con los otros equivalentes que codifican el E2 a menos de 8 o 7 nucleótidos consecutivos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas secuencias ilustrativas, de modo que se pueden diseñar sobre este mismo principio versiones alternativas de moléculas de ácido nucleico degeneradas que codifican polipéptidos E2 del virus del papiloma tal como se han definido anteriormente.

Un vector preferente según la presente invención comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-16, tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, el polipéptido E2 de presentación membranaria y de replicación deficiente que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 7), una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-18, tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, el polipéptido E2 de presentación membranaria y de replicación deficiente que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 8), una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-33, tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, el polipéptido E2 de presentación membranaria y de replicación deficiente que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 70), y una cuarta molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-52, tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, el polipéptido E2 de presentación membranaria y de replicación deficiente que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n°: 71). Más preferentemente, la primera molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 12 o consiste esencialmente en la misma; la segunda molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 13 o consiste esencialmente en la misma; la tercera molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 67 o consiste esencialmente en la misma, y/o la cuarta molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 69 o consiste esencialmente en la misma. Más preferentemente, el vector según la presente invención es un vector de MVA y las cuatro moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido E2 están insertadas en la delección III. Aún más preferentemente, la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico están bajo el control del promotor H5R del virus de la vaccinia y se disponen en orientación opuesta entre sí, mientras que la tercera y la cuarta moléculas de ácido nucleico están bajo el control del promotor p7.5K del virus de la vaccinia y se disponen en orientación opuesta entre sí.

En otro aspecto de esta forma de realización, el mismo polipéptido obtenido a partir de organismos estrechamente relacionados es preferentemente un polipéptido E6, un polipéptido E7 o los dos polipéptidos E6 y E7. Los polipéptidos E6 y E7 se pueden expresar de forma independiente o como polipéptido de fusión. Preferentemente, los polipéptidos E6 y/o E7 codificados se modifican de modo que se anclan a la membrana y sean no oncogénicos, tal como se ha definido en la presente memoria.

En el contexto nativo, las secuencias nativas de E6 de VPH-16 y VPH-18 presentan un 63% de homología en el nivel de los nucleótidos, mientras que las secuencias nativas de E7 de VPH-16 y VPH-18 presentan un 57% de homología entre sí. Sin embargo, en ambos casos, las secuencias nativas de VPH-16 y VPH-18 comparten diversas porciones de 40 nucleótidos o más que presentan el 80% o más del 80% de homología (véase la figura 2). Se prevé que la presencia de estas porciones homólogas afecte negativamente a la estabilidad de un vector que coexpresa los genes de E6 y/o E7 de VPH-16 y VPH-18. Entre estas porciones homólogas puede tener lugar una recombinación homóloga que provoque la pérdida de las secuencias de nucleótidos comprendidas entre ellas, y por lo tanto la extinción de genes.

Según la presente invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos E6 y E7 de VPH-16 y/o VPH-18 se pueden modificar degenerando el patrón de uso de codones a fin de reducir la homología a menos del 75%, especialmente en las porciones homólogas. En la SEC ID n°: 14 se indica un ejemplo representativo de una

molécula de ácido nucleico degenerada que codifica un polipéptido E6 de VPH-18, y en la SEC ID nº: 15 se indica un ejemplo representativo de una molécula de ácido nucleico degenerada modificada que codifica un polipéptido E7 de VPH-18. Más específicamente, la SEC ID nº: 14 y la SEC ID nº: 15 se han diseñado con el fin de reducir la homología con los equivalentes de VPH-16 a menos de 8, 7, 6 o, preferentemente, 5 nucleótidos consecutivos, a la vez que codifican polipéptidos E6 y E7 de VPH-18 anclados a la membrana y no oncogénicos. Sin embargo, sobre este principio se pueden diseñar versiones alternativas de moléculas de ácido nucleico degeneradas que codifican polipéptidos E6 y/o E7 del virus del papiloma, tal como se ha definido anteriormente.

Un vector preferente según la presente invención comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E6 de VPH-16, tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, anclado a la membrana y no oncogénico) y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E6 de VPH-18 tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, anclado a la membrana y no oncogénico), en el que la segunda molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID nº: 14 o consiste esencialmente en la misma. Un vector preferente según la presente invención comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E7 de VPH-16, tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, anclado a la membrana y no oncogénico) y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E7 de VPH-18 tal como se define en la presente memoria (por ejemplo, anclado a la membrana y no oncogénico), en el que la segunda molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID nº: 15 o consiste esencialmente en la misma. Más preferentemente, el vector según la presente invención es un vector de MVA, la primera molécula de ácido nucleico se coloca bajo el control del promotor 7.5K del virus de la vaccinia y la segunda molécula de ácido nucleico se coloca bajo el control del promotor H5R del virus de la vaccinia, y la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico están insertadas en la delección III de dicho vector de MVA.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica una fusión de un polipéptido E6 de VPH-16 con un polipéptido E7 de VPH-16, y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una fusión de un polipéptido E6 de VPH-18 con un polipéptido E7 de VPH-18, en el que dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico no comprenden una porción de 40 o más nucleótidos continuos que presentan un porcentaje de homología de aproximadamente el 75% o mayor del 75%.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E6 de VPH-16, una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E6 de VPH-18, una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de E7 de VPH-16 y una cuarta molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de E7 de VPH-18, en el que dichas primera, segunda, tercera y cuarta moléculas de ácido nucleico no comprenden una porción de 40 o más nucleótidos continuos que presentan un porcentaje de homología del 75% o mayor del 75%. Preferentemente, la segunda molécula de ácido nucleico comprende la SEC ID nº: 14, o consiste esencialmente en la misma, o consiste en la misma, y/o la cuarta molécula de ácido nucleico comprende la SEC ID nº: 15, o consiste esencialmente en la misma, o consiste en la misma. Más preferentemente, el vector según la presente invención es un vector de MVA, la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico se disponen en una orientación opuesta entre sí bajo el control del promotor 7.5K del virus de la vaccinia, y la tercera y la cuarta moléculas de ácido nucleico se disponen en orientación opuesta entre sí, cada una de ellas bajo el control del promotor H5R del virus de la vaccinia y la primera, la segunda, la tercera y la cuarta moléculas de ácido nucleico están insertadas en la delección III de dicho vector de MVA.

En otro aspecto, la presente invención también da a conocer una molécula de ácido nucleico sustancialmente aislada que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de entre SEC ID nº: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 66, 67, 68 o 69, o que consiste esencialmente en la misma, o consiste en la misma.

En otra forma de realización de la presente invención, la primera y la segunda y, si existen, la tercera y la cuarta moléculas de ácido nucleico comprendidas en el vector según la presente invención se presentan en una forma adecuada para la expresión de los polipéptidos codificados en una célula hospedadora o individuo, lo que significa que se disponen bajo el control de las secuencias reguladoras necesarias para su expresión.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencias reguladoras" se refiere a cualquier secuencia que permite, facilita o modula la expresión de una molécula de ácido nucleico en una determinada célula hospedadora, incluidos la replicación, la duplicación, la transcripción, el corte y empalme, la traducción, la estabilidad y/o el transporte del ácido nucleico o uno de sus derivados (es decir, ARNm) en la célula hospedadora. En el contexto de la presente invención, las secuencias reguladoras están "operativamente unidas" a la molécula de ácido nucleico que se pretende expresar, es decir que se disponen en una relación funcional que permite la expresión en una célula hospedadora o individuo. Dichas secuencias reguladoras son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego). El experto en la materia apreciará que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como el tipo de vector, la célula hospedadora, el nivel de expresión deseado, etc.

El promotor tiene una especial importancia y la presente invención comprende la utilización de promotores constitutivos que dirigen la expresión de las moléculas de ácido nucleico en muchos tipos de células hospedadoras y de promotores que dirigen la expresión sólo en determinadas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias

reguladoras específicas de tejido), o en respuesta a sucesos específicos o a factores exógenos (por ejemplo, por la temperatura, un aditivo nutriente, una hormona u otro ligando). Entre los promotores adecuados para la expresión constitutiva en sistemas eucarióticos se incluyen promotores víricos, tales como el promotor de SV40, el promotor temprano inmediato o potenciador de citomegalovirus (CMV) (Boshart *et al*, 1985, Cell 41, 521-530), los promotores tempranos y tardíos de adenovirus, el promotor de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS-1) y repeticiones terminales largas retrovíricas (por ejemplo, las LTR del MoMuLV y del virus del sarcoma de Rous (RSV)), así como promotores celulares tales como el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) (Hitzeman *et al*, 1983, Science 219, 620-625; Adra *et al*, 1987, Gene 60, 65-74). Entre los promotores adecuados útiles para dirigir la expresión de las moléculas de ácido nucleico en un vector poxvírico se incluyen los promotores 7.5 K, H5R, TK, p28, p11 o K1L del virus de la vaccinia. Alternativamente, se puede utilizar un promotor sintético, tal como los descritos en Chakrabarti *et al* (1997, Biotechniques 23, 1094-1097), Hammond *et al* (1997, J. Virological Methods 66, 135-138) y Kumar y Boyle (1990, Virology 179, 151-158) así como promotores quiméricos entre los promotores poxvíricos tempranos y tardíos.

Los promotores inducibles se regulan mediante compuestos administrados de forma exógena, e incluyen, sin limitación, el promotor de la metalotioneína (MT) inducible por cinc (Mc Ivor *et al*, 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), el promotor del virus del tumor mamario de ratón inducible por la dexametasona (Dex) (MMTV), el sistema promotor de la polimerasa de T7 (documento WO 98/10088), el promotor de la ecdisona de insecto (No *et al*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351), el promotor represible por tetraciclina (Gossen *et al*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551), el promotor inducible por tetraciclina (Kim *et al*, 1995, J. Virol. 69, 2565-2573), el promotor inducible por RU486 (Wang *et al*, 1997, Nat. Biotech. 15, 239-243 y Wang *et al*, 1997, Gene Ther. 4, 432-441), el promotor inducible por rapamicina (Magari *et al*, 1997, J. Clin. Invest. 100, 2865-2872) y los promotores lac, TRP y TAC de *E. coli*.

Las secuencias reguladoras que se utilizan en el contexto de la presente invención también pueden ser específicas de tejido para dirigir la expresión de las moléculas de ácido nucleico en tejidos específicos en los que se desea obtener un beneficio terapéutico. Los promotores adecuados se pueden tomar de genes que se expresan preferentemente en células tumorales. Dichos genes se pueden identificar, por ejemplo, por visualización e hibridación genómica comparativa (véase, por ejemplo, los documentos US nº 5.759.776 y nº 5.776.683).

Los expertos en la materia apreciarán que los elementos reguladores que controlan la expresión de las moléculas de ácido nucleico comprendidas en el vector según la presente invención pueden comprender además elementos adicionales para la iniciación, la regulación y/o la terminación adecuadas de la transcripción (por ejemplo, las secuencias de terminación de la transcripción poliA), el transporte de ARNm (por ejemplo, secuencias de señal de localización nuclear), el procesamiento (por ejemplo, señales de corte y empalme), la estabilidad (por ejemplo, intrones y secuencias no codificantes 5' y 3'), y la traducción (por ejemplo, secuencias líder tripartitas, sitios de unión de ribosomas, secuencias de Shine-Dalgarno, etc.) en la célula hospedadora o individuo.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer partículas víricas infecciosas que comprenden el vector descrito anteriormente. En la presente memoria no se pretende describir con detalle los diversos métodos conocidos para la producción de partículas víricas infecciosas. Habitualmente, dichas partículas víricas se producen por un proceso que comprende las etapas de (a) introducción del vector vírico en una línea celular apropiada, (b) cultivo de la línea celular en condiciones adecuadas para permitir la producción de dicha partícula vírica infecciosa, recuperación de la partícula vírica infecciosa producida a partir del cultivo de dicha línea celular y, opcionalmente, la purificación de dicha partícula vírica infecciosa recuperada.

Habitualmente, cuando el vector vírico es defectuoso, las partículas infecciosas se producen en una línea celular de complementación o utilizando un virus auxiliar que proporciona *en trans* los genes víricos no funcionales. Por ejemplo, entre las líneas celulares adecuadas para complementar vectores adenovíricos con delección de E1 se incluyen las células 293 (Graham *et al*, 1997, J. Gen. Virol. 36, 59-72), las células PER-C6 (Fallaux *et al*, 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917) y las células HER96. Son células adecuadas para la propagación de vectores poxvíricos las células aviares, y preferentemente fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF) preparados a partir de embriones de pollo obtenidos en huevos fertilizados. Las células productoras se pueden cultivar en biorreactores de fermentación, matraces y placas de Petri convencionales, en condiciones de temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiadas.

Las partículas víricas infecciosas se pueden recuperar a partir del sobrenadante de cultivo o de las células tras la lisis. Se pueden purificar adicionalmente mediante técnicas estándar (cromatografía o ultracentrifugación tal como se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/27677, WO 98/00524, WO 98/22588, WO 98/26048, WO 00/40702, EP 1 016 700 y WO 00/50573).

En otro aspecto, la presente invención da a conocer células hospedadoras que comprenden las moléculas de ácido nucleico, los vectores o las partículas víricas infecciosas descritos anteriormente. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "célula hospedadora" define cualquier célula que puede ser o ha sido receptora del vector o la partícula vírica infecciosa según la presente invención y la descendencia de la misma. Este término, que debe interpretarse en sentido amplio, incluye células aisladas, un grupo de células o una organización particular de

células, por ejemplo en un tejido u órgano. Dichas células pueden ser células primarias, transformadas o cultivadas.

En el contexto de la presente invención, entre las células hospedadoras se incluyen células procarióticas (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Listeria*), células eucarióticas inferiores, como levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* o *Pichia pastoris*) y otras células eucarióticas, tales como células de insecto, células vegetales y células eucarióticas superiores, con una preferencia especial por las células de mamífero (por ejemplo, células humanas o no humanas). Entre los ejemplos representativos de células hospedadoras adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, células BHK (de riñón de cría de hámster), células MDCK (línea celular de riñón canino Madin-Darby), células CRFK (línea celular de riñón de gato Crandell), células CV-1 (línea celular de riñón de mono verde africano) células COS (por ejemplo, COS-7), células de ovario de hámster chino (CHO), células NIH/3T3 de ratón, células HeLa y células Vero. El término "célula hospedadora" también comprende células de complementación capaces de complementar, por lo menos, una función defectuosa de un vector de replicación deficiente según la presente invención (por ejemplo, un vector adenovirico), como los citados anteriormente.

Las células hospedadoras se pueden utilizar para la producción recombinante de los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico comprendidas en el vector o las partículas infecciosas según la presente invención. Dichas técnicas son bien conocidas en el sector técnico (véase, por ejemplo, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-2002, y la última edición de Sambrook *et al*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición que comprende las moléculas de ácido nucleico, el vector, la partícula vírica infecciosa o la célula hospedadora descritos anteriormente (también denominados el "agente activo" en la presente memoria) o cualquier combinación de los mismos. Ventajosamente, la composición es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente o agentes activos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los vehículos, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes, dispersantes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una dosis suficiente para el alivio de uno o más síntomas normalmente asociados con el estado patológico que se desea tratar o prevenir en un individuo. Referido a un uso profiláctico, este término significa una dosis suficiente para prevenir o retrasar el establecimiento de un estado patológico en un individuo. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz podría ser la cantidad suficiente para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en el individuo tratado, o la cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, ralentizar o retrasar la progresión del estado patológico (por ejemplo, la reducción del tamaño o la regresión de una lesión o tumor en un individuo, o la reversión de una infección vírica en un individuo infectado).

Deseablemente, la composición según la presente invención comprende uno o más vehículos y/o diluyentes no tóxicos a la dosis y la concentración empleadas. Dichos vehículo y/o diluyente se seleccionan preferentemente entre los que se utilizan habitualmente para formular composiciones en forma de dosificación unitaria o multidosis para la administración sistémica o mucosa. Un vehículo adecuado puede ser un disolvente, un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), un aceite vegetal, o mezclas adecuadas de los mismos. El diluyente es preferentemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico, y tiene una fuerza iónica relativamente baja. Entre los ejemplos representativos de diluyentes adecuados se incluyen el agua estéril, una solución salina fisiológica (por ejemplo, cloruro de sodio), la solución de Ringer, la glucosa, soluciones de trehalosa o sacarosa, la solución de Hank y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas (véase, por ejemplo, la última edición de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins). El pH de la composición según la presente invención se ajusta adecuadamente y se tampona con el fin de que sea apropiado para su utilización en seres humanos o animales, preferentemente a un pH fisiológico o ligeramente básico (entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9, con una especial preferencia por un valor de aproximadamente 8 u 8,5). Entre los tampones adecuados se incluyen un tampón de fosfato (por ejemplo, PBS), un tampón de bicarbonato y/o un tampón Tris.

La composición según la presente invención puede presentarse en diversas formas, por ejemplo, congelada, sólida (por ejemplo, en forma de polvo seco o liofilizada) o líquida (por ejemplo, acuosa). Una composición sólida del agente activo más cualquier ingrediente o ingredientes adicionales deseados se puede obtener a partir de una solución de la misma previamente filtrada en condiciones estériles y sometida a secado al vacío y liofilización. Si se desea, se puede almacenar en una ampolla estéril, lista para su reconstitución mediante la adición de un vehículo adecuado antes de su utilización.

Una composición particularmente preferente (especialmente cuando el agente activo es un vector adenovirico) se formula en sacarosa 1 M, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, Tween 80 54 mg/l, Tris 10 mM, pH 8,5. Otra composición preferente se formula en manitol 10 mg/ml, HSA 1 mg/ml, Tris 20 mM, pH 7,2 y NaCl 150 mM. Dichas formulaciones son particularmente adecuadas para preservar la estabilidad de la composición según la presente invención durante

un período de por lo menos dos meses a una temperatura de congelación (por ejemplo, -70°C, -40°C, -20°C) o de refrigeración (por ejemplo, 4°C).

La composición también puede contener uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar las propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables, incluidas, por ejemplo, la modificación o mantenimiento del pH, la osmolaridad, la viscosidad, la nitidez, el color, la esterilidad, la estabilidad, la liberación o la absorción en un individuo humano o animal. Entre los ejemplos representativos de componentes estabilizantes se incluyen polisorbato 80, L-arginina, polivinilpirrolidona, trehalosa y polímeros tales como polietilenglicol, que se pueden utilizar para obtener propiedades deseables de solubilidad, estabilidad y semivida (Davis *et al*, 1978, *Enzyme Eng.* 4, 169-173; Burnham *et al*, 1994, *Am. J. Hosp. Pharm.* 51, 210-218). Entre los agentes potenciadores de la viscosidad se incluyen la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol y el dextrano. La composición también puede contener sustancias conocidas en la técnica por potenciar la penetración o el transporte a través de una barrera mucosa o en un determinado órgano. Por ejemplo, una composición adecuada para la administración vaginal puede incluir eventualmente uno o más potenciadores de la absorción útiles para aumentar el tamaño de poro de las membranas mucosas.

Además, la composición según la presente invención puede comprender uno o más adyuvantes adecuados para la administración sistémica o mucosa en los seres humanos. El término “adyuvante” se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de mejorar la respuesta inmunitaria a un determinado antígeno. El adyuvante se puede administrar en el sitio del antígeno o cerca del mismo. La potenciación de la inmunidad humoral se manifiesta típicamente por un aumento significativo (habitualmente de más de 10 veces) del título de anticuerpos que responden al antígeno. La potenciación de la inmunidad celular se puede medir, por ejemplo, mediante un ensayo cutáneo positivo, un ensayo de linfocitos T citotóxicos o un ensayo ELISPOT para IFN γ o IL-2. Preferentemente, el adyuvante que se utiliza en la presente invención es capaz de estimular la inmunidad frente al agente activo, especialmente a través de receptores de tipo Toll (TLR), tales como TLR-7, TLR-8 y TLR-9. Entre los ejemplos representativos de adyuvantes útiles se incluyen, sin limitación, alumbre, emulsión de aceite mineral, tal como el adyuvante completo o incompleto (IFA) de Freund, lipopolisacáridos o un derivado de los mismos (Ribi *et al*, 1986, *Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ. Corp., Nueva York, pág. 407-19), saponinas tales como QS21 (Sumino *et al*, 1998, *J. Virol.* 72, 4931-9; WO 98/56415), compuestos de imidazoquinolina, tales como imiquimod (Suader, 2000, *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, S6-S11), derivado de 1H-imidazo(4,5-c)quinolon-4-amina (AldaraTM) y compuestos relacionados (Smorlesi, 2005, *Gene Ther.* 12, 1324-32), oligodesoxinucleótidos de tipo citosina-fosfato-guanosina, como CpG (Chu *et al*, 1997, *J. Exp. Med.* 186: 1623; Tritel *et al*, 2003, *J. Immunol.* 171: 2358-2547) y péptidos catiónicos, tales como IC-31 (Kritsch *et al*, 2005, *J. Chromatogr. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 822, 263-70).

La molécula de ácido nucleico, el vector, la partícula infecciosa o la composición según la presente invención se pueden administrar por diversos modos de administración, incluidas las administraciones sistémica, tópica y mucosa. La administración sistémica se puede llevar a cabo por cualquier medio, por ejemplo, por inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intravascular e intraarterial. Las inyecciones pueden estar constituidas por jeringas y agujas convencionales, o por cualquier otro dispositivo adecuado disponible en la técnica. La administración mucosa se puede llevar a cabo por vía oral, nasal, intratraqueal, intrapulmonar, intravaginal o intrarrectal. La administración tópica se puede llevar a cabo por medios transdérmicos (por ejemplo, mediante parches y similares). La administración intramuscular o subcutánea es particularmente preferente con vectores víricos y partículas infecciosas como agentes activos.

La dosificación apropiada puede variar en función de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente activo concreto, la edad, salud y peso del individuo, el estado o estados patológicos que se van a tratar, la naturaleza y extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento, la necesidad de prevención o terapia y/o el efecto deseado. La dosis también se calculará en función de la vía de administración concreta seleccionada. El médico responsable podrá llevar a cabo de forma rutinaria el refinamiento de los cálculos necesarios para determinar la dosis adecuada para el tratamiento a la luz de las circunstancias relevantes. Como orientación general, la dosis adecuada para partículas adenovíricas varía de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{13} ui (unidades infecciosas), de manera deseable de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^{12} ui, y preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} ui. La dosis adecuada para las partículas de virus de la vaccinia varía de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} ufp (unidades formadoras de placas), deseablemente de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 ufp y preferentemente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 5×10^8 ufp. Los plásmidos de vector se pueden administrar en dosis comprendidas entre 10 μ g y 20 mg, y preferentemente entre 100 μ g y 2 mg.

Además, la administración se puede llevar a cabo en una sola dosis o, alternativamente, en varias dosis según los protocolos, dosificaciones y regímenes estándar durante varias horas, días y/o semanas. Además, la administración se puede llevar a cabo por inyección intravenosa rápida o infusión continua. Por ejemplo, el individuo se puede tratar, por lo menos, con dos (por ejemplo, de 2 a 10) administraciones de la molécula de ácido nucleico, el vector, la partícula infecciosa o la composición descritos anteriormente. Preferentemente, se lleva a cabo una primera serie de administraciones de forma secuencial dentro de un período que varía de unos pocos días a 4 semanas, seguida de una segunda serie (por ejemplo, una o dos administraciones) administrada dentro de un período de entre uno y 6

meses después de la última administración de la primera serie. El período transcurrido entre cada una de las administraciones de la segunda serie puede ser de entre unos días y 4 semanas. En una forma de realización preferente, la primera serie de administraciones comprende tres administraciones secuenciales a intervalos semanales y la segunda serie comprende una administración dentro de los 4 a 6 meses posteriores a la primera serie. Como orientación general, en el caso del vector de MVA, la vía de administración precedente es la subcutánea con una dosis de partículas de MVA comprendida entre 10^6 y 5×10^8 ufp.

La molécula de ácido nucleico, el vector, la partícula infecciosa, la célula hospedadora o la composición según la presente invención se pueden introducir en un individuo para tratar o prevenir diversos estados patológicos, incluidas enfermedades genéticas, enfermedades congénitas y enfermedades adquiridas. La presente invención también se refiere a la utilización de la molécula de ácido nucleico, el vector, la partícula infecciosa, la célula hospedadora o la composición según la presente invención para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento o la prevención de dichos estados patológicos. Es particularmente adecuada para el tratamiento o la prevención de enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones víricas y/o bacterianas), cánceres y enfermedades de inmunodeficiencia. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cáncer" comprende cualquier enfermedad cancerosa que resulta de una proliferación celular no deseada, e incluye tumores difusos o localizados, metástasis, pólipos cancerosos y lesiones preneoplásicas (por ejemplo, las neoplasias).

Las enfermedades infecciosas comprendidas en el contexto de la presente invención incluyen cualquier estado asociado con la infección por un microorganismo patógeno, tal como se ha descrito anteriormente. Entre los cánceres comprendidos en el contexto de la presente invención se incluyen, sin limitación, el glioblastoma, el sarcoma, el melanoma, el mastocitoma, el carcinoma, así como el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer testicular, el cáncer de ovario, el cáncer de endometrio, el cáncer de cuello uterino (particularmente los asociados con una infección por el virus del papiloma), los cánceres de pulmón (por ejemplo, el carcinoma de células grandes, el carcinoma microcítico, el carcinoma de células escamosas y adenocarcinomas), el cáncer renal, el cáncer de vejiga, el cáncer de hígado, el cáncer de colon, el cáncer anal, el cáncer de páncreas, el cáncer de estómago, el cáncer gastrointestinal, el cáncer de la cavidad bucal, el cáncer de laringe, el cáncer de cerebro y del SNC, los cánceres de piel (por ejemplo, melanoma y no melanoma), los cánceres de la sangre (linfomas, leucemias, sobre todo si han formado una masa sólida), el cáncer de huesos, el retinoblastoma y el cáncer de tiroides.

En una forma de realización preferente, la presente invención se utiliza para el tratamiento preventivo o curativo de una afección asociada con la infección por un virus del papiloma (especialmente un VPH HR), tal como una infección persistente o lesiones premalignas y malignas. El término "infección persistente" se refiere a la fase asintomática de la infección por el virus del papiloma en un individuo infectado en el que no se ha producido la erradicación del virus. Generalmente no se observan signos clínicos. Entre los ejemplos de lesiones premalignas se incluyen, sin limitación, una neoplasia intraepitelial de grado bajo, moderado o alto, que se puede detectar en diversos tejidos, tal como la NIC (neoplasia intraepitelial cervicouterina), la neoplasia intraepitelial vulvar (NIV), la neoplasia intraepitelial anal (NIA), la neoplasia intraepitelial peneana (NIP) y la neoplasia intraepitelial vaginal (NIVa). Entre los ejemplos de lesiones malignas se incluyen, sin limitación, el carcinoma de cuello uterino, el carcinoma anal, el cáncer vaginal, el cáncer de pene y el cáncer de boca. La molécula de ácido nucleico, el vector, la partícula infecciosa, la célula hospedadora o la composición según la presente invención que codifican polipéptidos del virus del papiloma están particularmente destinados al tratamiento de lesiones premalignas, especialmente lesiones de tipo NIC2/3, o lesiones malignas, especialmente de carcinoma de cuello uterino. En otra forma de realización, la presente invención también se puede utilizar para el tratamiento preventivo o curativo de una afección asociada con la infección por el virus de la hepatitis (por ejemplo, VHB o VHC), tal como una infección persistente, una hepatitis crónica o aguda o un cáncer de hígado.

El agente activo se puede utilizar solo o, si se desea, junto con modalidades terapéuticas convencionales (por ejemplo, radiación, quimioterapia y/o cirugía). Las modalidades terapéuticas convencionales se aplican al individuo animal o humano de acuerdo con los protocolos estándar y utilizando agentes, dosis y regímenes estándar, y dichas modalidades se pueden aplicar antes, durante y/o después de la administración del agente o agentes activos según la presente invención. Por ejemplo, para el tratamiento de afecciones asociadas con la infección por VHC, el método o utilización según la presente invención se asocia preferentemente, por ejemplo, con inhibidores de la proteasa (por ejemplo, inhibidores de la serina proteasa tal como VX950, de Vertex), inhibidores de la polimerasa, inhibidores de la helicasa, antifibróticos, análogos de nucleósidos, agonistas de TLR, ARNip, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos anti-VHC, moduladores inmunitarios, vacunas terapéuticas y agentes antitumorales utilizados convencionalmente en el tratamiento de los hepatocarcinomas asociados al VHC (por ejemplo, adriamicina o una mezcla de adriamicina, lipiodol y spongel administrada generalmente por quimioembolización en la arteria hepática). Una combinación particularmente adecuada incluye el tratamiento con IFN- α pegilado (IFN- α 2a o IFN- α 2b) y/o ribavirina, preferentemente por un período de entre 24 y 48 semanas antes de la administración del agente o agentes activos según la presente invención. Para el tratamiento de afecciones asociadas con la infección por el virus del papiloma, el método o la utilización según la presente invención se pueden asociar con procedimientos ablativos, tales como una escisión electroquirúrgica con asa. El método o utilización también se puede llevar a cabo junto con uno o más inmunostimulantes, tales como citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, IFNg) o productos génicos suicidas (por ejemplo, timidina cinasa de VHS-1 que se describe en Caruso *et al*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7024-28; o FCU-1, que se describe en el documento WO 99/54481), o uno o más vectores que expresan dicho

polipéptido o polipéptidos.

En otra forma de realización, el método o utilización según la presente invención se lleva a cabo de acuerdo con una modalidad terapéutica de sensibilización y refuerzo que comprende administraciones secuenciales de una o más composiciones de sensibilización y una o más composiciones de refuerzo. Habitualmente, las composiciones de sensibilización y de refuerzo utilizan diferentes vehículos que comprenden o codifican, por lo menos, un dominio antigénico común. El método o utilización según la presente invención puede comprender entre una y diez administraciones de la composición de sensibilización, seguidas por entre una y diez administraciones de la composición de refuerzo. Deseablemente, los intervalos de inyección están comprendidos entre un día y doce meses. Una modalidad preferente incluye tres o cuatro administraciones secuenciales de la composición de sensibilización separadas de forma independiente por un período comprendido entre 3 y 10 días (por ejemplo, una semana), seguidas por una o dos administraciones de la dosis de refuerzo entre una y varias semanas después de la última administración de sensibilización. Por otra parte, las composiciones de sensibilización y refuerzo se pueden administrar en el mismo sitio o en sitios alternativos por la misma vía o por diferentes vías de administración. Por ejemplo, las composiciones a base de polipéptidos se pueden administrar por una vía mucosa, mientras que las composiciones a base de vectores preferentemente se inyectan, por ejemplo, por inyección subcutánea para un vector de MVA o por inyección intramuscular para un plásmido de ADN y para un vector adenovírico. El vector, la partícula infecciosa o la composición según la presente invención se pueden utilizar para sensibilizar o reforzar, o para sensibilizar y reforzar a la vez, la respuesta inmunitaria en el individuo tratado. En una forma de realización, la sensibilización se lleva a cabo con un vector plasmídico según la presente invención y el refuerzo se lleva a cabo con una partícula infecciosa del virus de la vaccinia según la presente invención. En otra forma de realización, la sensibilización se lleva a cabo con una partícula infecciosa adenovírica según la presente invención y el refuerzo se lleva a cabo con una partícula infecciosa del virus de la vaccinia según la presente invención. En otra forma de realización, la sensibilización se lleva a cabo con una partícula infecciosa del virus de la vaccinia según la presente invención y el refuerzo se lleva a cabo con una partícula infecciosa adenovírica según la presente invención.

La presente invención se ha descrito de modo ilustrativo, y debe entenderse que la terminología utilizada pretende ser un conjunto de palabras descriptivas, más que limitativas. Naturalmente, es posible llevar a cabo muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a partir de la descripción anterior. Por consiguiente, debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la presente invención se puede poner en práctica de un modo diferente a lo descrito específicamente en la presente memoria.

Todas las descripciones de patente, publicaciones y entradas de bases de datos citadas anteriormente se incorporan específicamente en la presente memoria como referencia en su totalidad, en la misma medida que si cada patente, publicación o entrada individuales estuvieran específica e individualmente indicadas para ser incorporadas como referencia.

Leyendas de las figuras

La figura 1 ilustra la alineación de secuencias (A) entre los 59 nucleótidos presentes (a) al final de las secuencias de E1 de VPH-16 nativas y (b) al inicio de las secuencias de E2 de VPH-16, y (B) entre los 59 nucleótidos presentes (a) al final de las secuencias de E1 de VPH-16 nativas o al inicio de las secuencias de E2 de VPH-16 nativas, y (b) la SEC ID n°: 9.

La figura 2 ilustra la alineación de secuencias (A) entre las secuencias que codifican el E6 de VPH-16 y VPH-18, y (B) entre las secuencias que codifican el E6 de VPH-16 y la SEC ID n°: 14.

Los siguientes ejemplos son proporcionados para ilustrar la presente invención.

Ejemplos

Las construcciones que se describen a continuación se llevan a cabo según las técnicas generales de ingeniería genética y clonación molecular descritas con detalle en Maniatis *et al* (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) o según las recomendaciones del fabricante, cuando se utiliza un kit comercial. Las técnicas de amplificación de PCR son conocidas por el experto en la materia (véase, por ejemplo, PCR protocols -A guide to methods and applications, 1990, publicado por Innis, Gelfand, Sninsky y White, Academic Press). Los plásmidos recombinantes portadores del gen de resistencia a la ampicilina se replican en *E. coli* C600 (Stratagene), BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580) y NM522 sobre agar o medio líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico. Las construcciones de los virus de la vaccinia recombinantes se llevan a cabo según la tecnología convencional del sector, descrita en los documentos citados anteriormente y en Mackett *et al* (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) y Mackett *et al* (1984, J. Virol. 49, 857-864). El gen de selección *gpt* (xantina-guanina fosforribosiltransferasa) de *E. coli* (Falkner y Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854) se utiliza para facilitar la selección de los virus de la vaccinia recombinantes.

Ejemplo 1: Construcción de un vector de MVA que expresa los genes de E1 y E2 de VPH-16 (MVATG17410)a) Construcción de un vector de MVA recombinante que codifica el gen de E2 de VPH-16 (MVATG17408)5 *Clonación del gen de E2 de VPH-16*

Las secuencias de nucleótidos que codifican el E2 de VPH-16 se clonaron a partir del ADN genómico aislado de células CaSki (ATCC CRL-1550). El gen de E2 se amplificó utilizando los cebadores OTG16809 (SEC ID n°: 16) y OTG16810 (SEC ID n°: 17). El fragmento resultante se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y se insertó en pGEX2T (Amersham Biosciences) restringido por las mismas enzimas, obteniéndose pTG17239. La secuenciación del gen de E2 clonado mostró cinco mutaciones en comparación con la secuencia prototípica de E2 de VPH16 (descrita en Genbank NC-01526). Dos mutaciones eran silenciosas, y las tres no silenciosas (T210I, S219P, K310T) se corrigieron utilizando el kit QuickChange Site Directed Mutagenesis (Stratagene), obteniéndose pTG17268.

15 *Modificación del polipéptido E2 de VPH-16*

Las secuencias de nucleótidos de E2 incorporadas a pTG17268 se modificaron mediante mutagénesis dirigida al sitio con el fin de generar una variante de E2 de VPH-16 (E39A y 173A) designada E2*. Más específicamente, la función de replicación del E2 se suprimió mediante la sustitución del residuo de Glu de la posición 39 por una Ala, y la función de transactivación mediante la sustitución del residuo de Ile de la posición 73 por una Ala. El plásmido pTG17318 resultante comprende las secuencias modificadas que codifican el E2* de VPH-16.

El E2* de VPH-16 se modificó adicionalmente mediante la fusión en su extremo N-terminal a un péptido señal, y en su extremo carboxiterminal a una secuencia de anclaje a membrana derivada de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa PG; Genbank ay009097) con el fin de dirigir la presentación del E2* de VPH-16 en las células hospedadoras expresoras en la superficie de la membrana plasmática. Las secuencias de nucleótidos (SEC ID n°: 12) que codifican la variante de E2 deficiente de presentación membranaria, designadas SS-E2*-TMR, se volvieron a unir por triple PCR utilizando los siguientes cebadores: OTG17500 (SEC ID n°: 18), OTG17501 (SEC ID n°: 19), OTG17502 (SEC ID n°: 20), OTG17503 (SEC ID n°: 21), OTG17504 (SEC ID n°: 22) y OTG17505 (SEC ID n°: 23). La reensamblada se insertó en un vector derivado de pBS (Stratagene) para obtener pTG17360, y a continuación se clonó en un plásmido de transferencia de vaccinia posterior al promotor pH5R (Rosel *et al*, 1986, J. Virol. 60, 436-449), obteniéndose pTG17408.

El plásmido de transferencia está diseñado para permitir la inserción de la secuencia de nucleótidos que se pretende transferir por recombinación homóloga en la delección III del genoma de MVA. Se origina a partir del plásmido pTG1E (descrito en Braun *et al*, 2000, Gene Ther. 7, 1447-57) en el que se clonaron las secuencias flanqueantes (BRG3 y BRD3) que rodean la delección III de MVA, que a su vez se obtuvieron por PCR a partir de ADN de MVATGN33.1 (Sutter y Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847-51). El plásmido de transferencia también contiene una fusión entre la proteína verde fluorescente mejorada de *Aequorea victoria* (gen *eGFP*, aislado a partir de pEGP-C1, Clontech) y el gen de xantina-guanina fosforribosiltransferasa de *Escherichia coli* (gen *gpt*) bajo el control del promotor sintético temprano tardío del virus de la vaccinia p11K7.5 (proporcionado amablemente por R. Wittek, Universidad de Lausana). La síntesis de la xantina-guanina fosforribosiltransferasa permite que el MVA recombinante GPT⁺ forme placas en un medio selectivo que contiene ácido micofenólico, xantina e hipoxantina (Falkner *et al*, 1988, J. Virol. 62, 1849-54) y *eGFP* permite la visualización de las placas de MVA recombinante. El marcador de selección *eGPP-GPT* se coloca entre dos secuencias homólogas en la misma orientación. Cuando se alcanza la selección de clones, el marcador de selección se elimina fácilmente mediante varios pases sin selección, permitiendo el crecimiento de MVA recombinante de *eGPP-GPT*.

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

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

El análisis de la expresión de E2 se realizó por transferencia Western. Se infectaron CEF a una MOI de 0,2 con MVATG17408 y tras 24 horas se recolectaron las células. El análisis por transferencia Western se realizó utilizando anticuerpo TVG271 monoclonal anti-E2 comercial (Abcam). Se detectó la expresión de una proteína con un peso molecular aparente de 55 kDa, mientras que el peso molecular teórico de E2*-TMR es de 48,9 kDa. Tras el tratamiento de los extractos celulares con endoglicosidasa F, se observó una reducción del tamaño de la proteína recombinante, lo que sugiere que el polipéptido E2*-TMR expresado a partir de MVATG17408 está glicosilado en N.

b) Construcción de un MVA recombinante que codifica un gen de E1 de VPH-16 degenerado en la porción que se solapa con el gen E2 de VPH-16 (MVATG17409)

Las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido E1 de VPH-16 se clonaron a partir del ADN de células CaSki (ATCC CRL-1550). Más específicamente, el gen de E1 se amplificó en dos partes E1a (nt 1 a 1.102) y E1b (nt 1.001 a 1.950). Se utilizaron los cebadores OTG16811 (SEC ID n°: 24) y OTG16814 (SEC ID n°: 25) para amplificar el fragmento E1a, que se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y se insertó en pGEX2T restringido por las mismas enzimas, obteniéndose pTG17240. El fragmento E1b se generó utilizando OTG16813 (SEC ID n°: 26) y OTG16812 (SEC ID n°: 27) y se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI antes insertarse en pGEX2T, obteniéndose pTG17241. La secuenciación mostró 4 mutaciones en comparación con la secuencia prototípica de E1 de VPH-16 (descrito en Genbank NC-01526). Una mutación era silenciosa, y las tres mutaciones no silenciosas presentes en E1a (K130Q, N185T y T220S) se corrigieron por mutagénesis dirigida al sitio. A continuación, el gen de E1 completo se reensambló por clonación del fragmento E1a corregido en pTG17241 digerido por *Bsr*GI y *Eco*RI. El plásmido resultante se denominó pTG17289.

En el genoma de VPH-16, los 59 últimos nucleótidos del gen de E1 son idénticos a los 59 primeros nucleótidos del gen de E2. Con el fin de evitar el problema de la inestabilidad durante las etapas de producción de un vector de MVA que codifica los polipéptidos E1 y E2, esta porción de las secuencias que codifican el E1 se modificó mediante modificaciones del uso de codones a fin de disminuir la homología de secuencia con respecto a la secuencia que codifica el E2. La secuencia degenerada (SEC ID n°: 9) se obtuvo por amplificación del extremo 3' del gen de E1 utilizando los cebadores degenerados OTG17408 (SEC ID n°: 28) y OTG17409 (SEC ID n°: 29). El fragmento amplificado se digirió con *Nsi*I y *Bgl*II y se insertó en pTG17289 restringido por las mismas enzimas, obteniéndose pTG17340.

Las secuencias de E1 degeneradas de VPH-16 también se mutaron por mutagénesis dirigida al sitio con el fin de suprimir la función de replicación del polipéptido E1 codificado mediante la sustitución del residuo de Gly de la posición 482 del E1 de VPH-16 por un residuo de Asp (G482D; también designado E1* en la presente memoria), obteniéndose pTG17373.

Las secuencias E1deg* de VPH-16 también se modificaron con el fin de dirigir la expresión del polipéptido codificado a la superficie de la membrana plasmática de la célula mediante fusión con los péptidos señal y de anclaje a membrana derivados de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa ERA; descrita en Genbank N ° M38452). La secuencia SS-E1deg*-TMR (SEC ID n°: 10) se reconstituyó por triple PCR utilizando los cebadores OTG17560 (SEC ID n°: 30), OTG17561 (SEC ID n°: 31), OTG17562 (SEC ID n°: 32), OTG17563 (SEC ID n°: 33), OTG17564 (SEC ID n°: 34) y OTG17565 (SEC ID n°: 35). El fragmento resultante se insertó en un vector derivado de pBS (Stratagene), obteniéndose pTG17404. A continuación, la secuencia SS-E1deg*-TMR se clonó en el plásmido de transferencia de vaccinia posterior al promotor p7.5K (Cochran *et al*, 1985, J. Virol. 54, 30-7), obteniéndose pTG17409.

La generación de virus MVATG17409 se llevó a cabo en CEF mediante recombinación homóloga, tal como se ha descrito anteriormente.

c) Construcción de un vector de MVA recombinante que codifica los genes de E1 y E2 de VPH-16 (MVATG17410)

La secuencia SS-E1deg*-TMR controlada por el promotor p7.5K se aisló a partir de pTG17409 y se insertó en pTG17408, obteniéndose pTG17410.

La generación de virus MVATG17410 se llevó a cabo en CEF mediante recombinación homóloga, tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2: Construcción de un vector de MVA que codifica los genes de E1 y E2 de VPH-18 (MVATG17582)

Los genes E1 y E2 de VPH-18 se reconstituyeron como genes sintéticos y los oligonucleótidos se diseñaron con el fin de (i) reducir el porcentaje de homología entre las porciones homólogas compartidas por las secuencias de VPH-16 y VPH-18 nativas a menos del 75% (se alinearon las secuencias de los genes de E1 y E2 VPH-16 y VPH-18 y los oligonucleótidos se diseñaron con el fin de reducir la homología a menos de 5 nucleótidos consecutivos), (ii) reducir la homología a menos del 75% entre la porción de 59 nucleótidos presente en el extremo 3' de la secuencia de E1 de VPH-18 nativa y en el extremo 5' de la secuencia de E2 de VPH-18, y (iii) introducir las mutaciones que eliminan las funciones enzimáticas del producto génico de E1 y E2 de VPH-18 (E1: G489D, E2: E43A y I77A).

La secuencia degE1* de VPH-18 se reconstituyó mediante el ensamblaje de 50 oligonucleótidos y se clonó en un vector pBS, obteniéndose pTG17473. A continuación, la secuencia de E1 se fusionó a las secuencias de señalización de clones de la proteína F del virus del sarampión (SS-18E1deg*-TMF) mediante una triple PCR utilizando los cebadores OTG15315 (SEC ID n°: 36), OTG17881 (SEC ID n°: 37), OTG17882 (SEC ID n°: 38), OTG17883 (SEC ID n°: 39), OTG17884 (SEC ID n°: 40) y OTG17885 (SEC ID n°: 41). El fragmento resultante (SEC ID n°: 11) se clonó en un vector de transferencia de MVA bajo el control del promotor p7.5K, obteniéndose pTG17521.

La secuencia degE2* de VPH-18 se reconstituyó mediante el ensamblaje de 26 oligonucleótidos y se clonó en un vector pBS, obteniéndose pTG17498. La fusión con los péptidos señal y de anclaje a membrana de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa ERA; Genbank N° M38452) se llevó a cabo por triple PCR utilizando los cebadores
 5 OTG17875 (SEC ID n°: 42), OTG17876 (SEC ID n°: 43), OTG17877 (SEC ID n°: 44), OTG17878 (SEC ID n°: 45), OTG17879 (SEC ID n°: 46) y OTG17880 (SEC ID n°: 47). El casete SS-18E2*-TMR se insertó en el plásmido de transferencia de MVA posterior al promotor pH5R, obteniéndose pTG17552. Por último, el casete p7.5K-SS-E1deg*-TMF se aisló a partir de pTG17521 y se insertó en pTG17552, obteniéndose pTG17582.

10 La generación de MVATG17521, MVATG17552 y MVATG17582 recombinantes se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3: Construcción de un vector de MVA multivalente que expresa los genes de E1 y E2 de VPH-16 y VPH-18 (MVATG17583)

15 El casete p7.5K-SS-18E1deg*-TMF y el casete pH5R-SS-18E2*-TMR se introdujeron en pTG17410 (que contenía el casete p7.5K-SS-16E1deg*-TMR y el pH5R-SS-16E2*-TMR) y el plásmido de transferencia resultante se denominó pTG17583. La generación de MVATG17583 se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

20 Ejemplo 4: Construcción de un virus recombinante multivalente que expresa los genes de E6 y E7 de VPH-16 y VPH-18

El MVATG16327 es un virus MVA recombinante que expresa variantes de anclaje membranario y no oncogénicas de los polipéptidos E6 y E7 de VPH-16 y VPH-18. Las secuencias de nucleótidos de E6 y E7 se mutaron a fin de
 25 eliminar sus propiedades oncogénicas (E6* y E7*) y se fusionaron a secuencias que codificaban péptidos señal y de anclaje membranario adecuados (E6*tm, E7*tm). Más específicamente, el polipéptido E7* de VPH-18 se fusionó respectivamente en sus extremos N y C con los péptidos señal y de anclaje membranario de la glucoproteína F del virus del sarampión, mientras que el E6* de VPH-16, el E7* de VPH-16 y el E6* de VPH-18 se fusionaron con
 30 péptidos señal y de anclaje membranario derivados de los de la glucoproteína del virus de la rabia. Por otra parte, las secuencias de nucleótidos E6 y E7 de VPH-18 se modificaron adicionalmente por modificación del uso de codones a fin de disminuir la homología con sus equivalentes de VPH-16. Con este propósito, se alinearon las secuencias de los genes de VPH-16 y VPH-18 nativos y se llevó a cabo una degeneración de codones a fin de
 35 reducir la homología a menos de 5 nucleótidos consecutivos. En el vector, las secuencias de E6 de VPH-16 y VPH-18 se disponen bajo el control del promotor p7.5K en orientación opuesta entre sí, mientras que las secuencias de E7 de VPH-16 y VPH-18 están dirigidas por el promotor H5R y todos los casetes de expresión se insertan en la región de escisión III del genoma de MVA.

a) Construcción del casete de expresión E7*tm de VPH-16

40 El gen de E7 de VPH-16 se aisló a partir de células Caski y se modificó con el fin de que codificara un polipéptido E7 no oncogénico y de presentación membranaria (16E7*tmR), tal como se describe en el documento WO 99/03885. Se llevaron a cabo mutaciones no oncogénicas mediante la delección de los residuos de aminoácidos 21-26 (ΔDLYCYE) y la presentación membranaria por fusión de la secuencia mutada E7*, respectivamente, en sus
 45 extremos 5' y 3' con las secuencias que codifican los péptidos señal y de anclaje membranario clonados a partir de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa ERA; Genbank, número de acceso M38452). La secuencia resultante se clonó bajo el control del promotor temprano-tardío pH5R (Rosel *et al*, 1986. J. Virol. 60, 436-9) y el casete se introdujo en un vector derivado de pBS, obteniéndose pTG16161.

b) Clonación de los casetes de expresión E6*tm de VPH-16 y E6*tm de VPH-18

50 El gen de E6 de VPH-16 se aisló y modificó con el fin de que codificara un polipéptido E6 no oncogénico y de presentación membranaria, tal como se describe en el documento WO 99/03885. Se llevaron a cabo mutaciones no oncogénicas mediante la delección de los residuos de aminoácidos 118 a 122 (ΔCPEEK) y la presentación
 55 membranaria por fusión de la secuencia mutada E6*, respectivamente, en sus extremos 5' y 3' con las secuencias que codifican los péptidos señal y de anclaje membranario derivados de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa PG; Genbank, número de acceso ay009097). Esto se realizó mediante la inserción de la secuencia E6* mutada en un vector que contenía la secuencia del péptido señal y la secuencia del péptido de anclaje membranario separadas por un sitio *Bam*HI, obteniéndose pTG16097.

60 Se generó una secuencia E6 de VPH-18 sintética mediante el ensamblaje de los oligonucleótidos OTG15174 (SEC ID n°: 48), OTG15175 (SEC ID n°: 49), OTG15176 (SEC ID n°: 50), OTG15177 (SEC ID n°: 51), OTG15178 (SEC ID n°: 52), OTG15179 (SEC ID n°: 53), OTG15180 (SEC ID n°: 54) y OTG15181 (SEC ID n°: 55). Los oligonucleótidos se diseñaron con el fin de introducir la delección de codones que codifican los residuos de aminoácidos 113 a 117 (mutación no oncogénica ΔNPAEK) y para degenerar el uso de codones con el fin de reducir la homología con el
 65 gen de E6 de VPH-16 (secuencia degenerada). A continuación, la secuencia sintética resultante se fusionó respectivamente en sus extremos 5' y 3' con las secuencias que codifican los péptidos señal y de anclaje

membranario derivados del gen de la glucoproteína del virus de la rabia, a fin de obtener la secuencia indicada en la SEC ID n°: 14, obteniéndose pTG16160. Las secuencias E6*tmR de VPH-16 y degE6*tmR de VPH-18 se insertaron en orientación opuesta, cada una de ellas bajo el control del promotor p7.5K. A continuación, se introdujeron los casetes en pTG16161 para generar pTG16215.

5

c) Clonación del casete de expresión E7*tmF de VPH-18

Se generó una secuencia E7 de VPH-18 sintética mediante el ensamblaje de los oligonucleótidos OTG14773 (SEC ID n°: 56), OTG14774 (SEC ID n°: 57), OTG14775 (SEC ID n°: 58), OTG14776 (SEC ID n°: 59), OTG14777 (SEC ID n°: 60) y OTG14778 (SEC ID n°: 61). Los oligonucleótidos se diseñaron con el fin de introducir la delección de codones que codifican los residuos de aminoácidos 24 a 28 (mutación no oncogénica ΔDLLCH) y para degenerar el uso de codones con el fin de reducir la homología con el gen de E7 de VPH-16 (secuencia degenerada). A continuación, la secuencia sintética resultante se fusionó en sus extremos 5' y 3', respectivamente, con las secuencias codificantes de los péptidos señal y de anclaje membranario clonados a partir de la proteína F del virus del sarampión (descrita en el documento EP 0 305 229). La secuencia resultante (SEC ID n°: 15) se clonó bajo el control del promotor pH5R y el casete se introdujo en un vector derivado de pBS para generar pTG16015.

10

15

d) Construcción del plásmido de transferencia pTG16327

El plásmido de transferencia pTG6019 (descrito en el ejemplo 2 del documento WO 99/03885) contiene secuencias homólogas que flanquean la delección III de MVA. Se modificó como se describe a continuación. Se introdujo un policonector sintético, obtenido por hibridación de los cebadores OTG15040 (SEC ID n°: 62) y OTG15041 (SEC ID n°: 63), en pTG6019 digerido por *Bam*HI y *Sac*I, obteniéndose pTG16007. Se aisló un fragmento *Sac*I-*Sac*I que contenía el casete de expresión que codifica *gpt* de *E. coli* bajo el control del promotor temprano-tardío pH5R a partir de pTG14033 (descrito en el ejemplo 2 del documento EP 1 146 125) y se introdujo en pTG16007 digerido por *Sac*I, obteniéndose pTG16093. La síntesis de la xantina-guanina fosforribosiltransferasa permite que el MVA recombinante GPT⁺ forme placas en un medio selectivo que contiene ácido micofenólico, xantina e hipoxantina (Falkner *et al*, 1988. J. Virol. 62, 1849-54). El marcador de selección GPT se coloca entre dos secuencias homólogas en la misma orientación. Cuando se alcanza la selección de clones, el marcador de selección se elimina fácilmente mediante varios pases sin selección, permitiendo el crecimiento de MVA recombinante de *GPT*.

20

25

30

Se aisló un fragmento *Hind*III-*Sma*I que contenía el casete de expresión degE7*TMF de VPH-18 a partir de pTG16015 y se introdujo en pTG16093 digerido por las mismas enzimas, obteniéndose pTG16105. Por otro lado, se digirió pTG16215 con *Sal*I y *Eco*RI, se trató con ADN-polimerasa de T4 y el fragmento resultante que contenía los casetes de expresión E7*tmR de VPH-16, E6*tmR de VPH-16 y degE6*tmR de VPH-18 se introdujo en pTG16105 digerido por *Sma*I, obteniéndose pTG16327 (figura 2).

35

e) Generación de MVATG16327

La generación de MVATG16327 se llevó a cabo por recombinación homóloga en fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF). Con este propósito, se transfeció pTG16327 según la precipitación estándar de ADN con fosfato de calcio sobre CEF previamente infectados con MVATGN33.1 a una MOI de 0,1 ufp/célula. La selección vírica se llevó a cabo por tres rondas de purificación en placa sobre CEF en presencia de un medio selectivo que contenía ácido micofenólico, xantina e hipoxantina. A continuación se eliminó el marcador de selección por pase en un medio no selectivo. La ausencia de contaminación por MVA parental se verificó por PCR.

40

45

El análisis de la expresión génica se realizó por transferencia Western. Se infectaron CEF a una MOI de 0,2 con MVATG16327 y tras 24 horas se recolectaron las células. El análisis por transferencia Western se llevó a cabo utilizando anticuerpos policlonales de conejo contra las proteínas E6 y E7 de VPH-16 y VPH-18, respectivamente. Los resultados muestran que todos los polipéptidos de VPH estaban correctamente expresados a partir de MVATG16327.

50

f) Estudio de la estabilidad genética de MVATG16327

Se llevaron a cabo cinco pases de MVATG16327 sobre CEF infectados a una MOI de 10⁻² ufp/célula y 10⁻⁴ ufp/cell. La estabilidad genética se evaluó en 100 clones víricos aislados a partir del quinto pase de la reserva de investigación. Se utilizaron dos métodos: amplificación por PCR para determinar la estructura de los casetes de expresión y detección de antígenos por transferencia Western. Los resultados del análisis por PCR mostraron que el 99% de los clones contenía los casetes de expresión de interés. La inmunodetección puso de manifiesto que el 97% de los clones expresaban los cuatro antígenos: los polipéptidos E6*tm y E7*tm de VPH-16 y VPH-18.

55

60

Estos análisis mostraron que el 97% de los clones derivados de MVATG16327 se conformaron después de cinco pases, lo que indica una buena estabilidad genética de este constructo.

Ejemplo 5: Construcción de un vector de MVA multivalente que expresa los genes de E2 de VPH-16, VPH-18, VPH-33 y VPH-52.

5 Geneart (Regensburg, Alemania) sintetizó un gen sintético que codifica el polipéptido E2 de VPH-33. La secuencia sintética se diseñó a fin de (i) reducir el porcentaje de homología a menos del 75% con los genes de E2 de VPH-16, VPH-18 y VPH-52 (si es posible, las porciones homólogas se reducen a menos de 6 nucleótidos consecutivos), y (ii) introducir las mutaciones que eliminan las funciones enzimáticas del producto génico de VPH-33 (E39A y I73A).

10 A continuación, la secuencia de degE2* de VPH-33 se fusionó con la secuencia de nucleótidos que codifica los péptidos señal y de anclaje membranario de la glucoproteína del virus de la rabia (cepa ERA, Genbank N° M38452). Esto se llevó a cabo por triple PCR utilizando los cebadores OTG18962 (SEC ID n°: 72), OTG18963 (SEC ID n°: 73), OTG18964 (SEC ID n°: 74), OTG18965 (SEC ID n°: 75), OTG18966 (SEC ID n°: 76) y OTG18967 (SEC ID n°: 77). El fragmento resultante (SEC ID n°: 67) que codifica el polipéptido SS-33degE2*-TMR se clonó en un vector de transferencia de MVA bajo el control del promotor p7.5K, y se generaron partículas víricas tal como se ha descrito anteriormente.

15 Geneart (Regensburg, Alemania) sintetizó un gen sintético que codifica el polipéptido E2 de VPH-52. La secuencia sintética se diseñó a fin de (i) reducir el porcentaje de homología a menos del 75% con los genes de E2 de VPH-16, VPH-18 y VPH-33 (preferentemente, las porciones homólogas se reducen a menos de 6 nucleótidos consecutivos), y (ii) introducir las mutaciones que eliminan las funciones enzimáticas del producto génico de VPH-52 (E39A y I73A).

20 A continuación, la secuencia de E2*deg de VPH-52 se fusionó con secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos señal y de anclaje membranario de la proteína F del virus del sarampión (obteniéndose SS-52E2*deg-TMF) mediante una triple PCR utilizando los cebadores OTG18968 (SEC ID n°: 78), OTG18969 (SEC ID n°: 79), OTG18970 (SEC ID n°: 80), OTG18971 (SEC ID n°: 81), OTG18972 (SEC ID n°: 82) y OTG18973 (SEC ID n°: 83).

25 El fragmento resultante (SEC ID n°: 69) que codifica el polipéptido SS-52E2*deg-TMF se insertó en un vector de transferencia de MVA posterior al promotor p7.5K, y se generaron partículas víricas tal como se ha descrito anteriormente.

30 Se introdujeron el casete pH5R-SS-18E2*-TMR que codifica el polipéptido E2 de VPH-18 de presentación membranaria y enzimáticamente deficiente (aislado a partir de pTG17552), el casete p7.5-SS-33degE2*-TMR que codifica el polipéptido E2 de VPH-33 de presentación membranaria y enzimáticamente deficiente y el casete p7.5-SS-52degE2*-TMF que codifica el polipéptido E2 de VPH-52 de presentación membranaria y enzimáticamente deficiente se introdujeron en pTG17408 (que contenía el casete pH5R-SS-16E2*-TMR), y se generaron partículas víricas tal como se ha descrito anteriormente.

Listado de secuencias

40 <110> TRANSGENE S.A.
SILVESTRE Nathalie
SCHMITT Doris

45 <120> Vectores para la expresión de múltiples genes

<130> TG183 EXT

<150> EP07360019.9

<151> 2007-05-15

50 <160> 83

<170> PatentIn versión 3.3

55 <210> 1

<211> 649

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

60 <400> 1

ES 2 416 361 T3

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

ES 2 416 361 T3

```

      290                295                300
Met Met Ile Glu Pro Pro Lys Leu Arg Ser Thr Ala Ala Ala Leu Tyr
305                310                315                320
Trp Tyr Lys Thr Gly Ile Ser Asn Ile Ser Glu Val Tyr Gly Asp Thr
      325                330                335
Pro Glu Trp Ile Gln Arg Gln Thr Val Leu Gln His Ser Phe Asn Asp
      340                345                350
Cys Thr Phe Glu Leu Ser Gln Met Val Gln Trp Ala Tyr Asp Asn Asp
      355                360                365
Ile Val Asp Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Lys Tyr Ala Gln Leu Ala Asp
      370                375                380
Thr Asn Ser Asn Ala Ser Ala Phe Leu Lys Ser Asn Ser Gln Ala Lys
385                390                395                400
Ile Val Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Arg His Tyr Lys Arg Ala Glu
      405                410                415
Lys Lys Gln Met Ser Met Ser Gln Trp Ile Lys Tyr Arg Cys Asp Arg
      420                425                430
Val Asp Asp Gly Gly Asp Trp Lys Gln Ile Val Met Phe Leu Arg Tyr
      435                440                445
Gln Gly Val Glu Phe Met Ser Phe Leu Thr Ala Leu Lys Arg Phe Leu
      450                455                460
Gln Gly Ile Pro Lys Lys Asn Cys Ile Leu Leu Tyr Gly Ala Ala Asn
465                470                475                480
Thr Gly Lys Ser Leu Phe Gly Met Ser Leu Met Lys Phe Leu Gln Gly
      485                490                495
Ser Val Ile Cys Phe Val Asn Ser Lys Ser His Phe Trp Leu Gln Pro
      500                505                510
Leu Ala Asp Ala Lys Ile Gly Met Leu Asp Asp Ala Thr Val Pro Cys
      515                520                525
Trp Asn Tyr Ile Asp Asp Asn Leu Arg Asn Ala Leu Asp Gly Asn Leu
      530                535                540
Val Ser Met Asp Val Lys His Arg Pro Leu Val Gln Leu Lys Cys Pro
545                550                555                560
Pro Leu Leu Ile Thr Ser Asn Ile Asn Ala Gly Thr Asp Ser Arg Trp
      565                570                575
Pro Tyr Leu His Asn Arg Leu Val Val Phe Thr Phe Pro Asn Glu Phe
      580                585                590
Pro Phe Asp Glu Asn Gly Asn Pro Val Tyr Glu Leu Asn Asp Lys Asn
      595                600                605
Trp Lys Ser Phe Phe Ser Arg Thr Trp Ser Arg Leu Ser Leu His Glu
      610                615                620
Asp Glu Asp Lys Glu Asn Asp Gly Asp Ser Leu Pro Thr Phe Lys Cys
625                630                635                640
Val Ser Gly Gln Asn Thr Asn Thr Leu
      645

```

<210> 2

<211> 365

5 <212> PRT

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

<400> 2

```

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

```

10

ES 2 416 361 T3

Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu
65 70 75 80
Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp
85 90 95
Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys
100 105 110
His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr
115 120 125
Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser
130 135 140
Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val
145 150 155 160
His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu
165 170 175
Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val
180 185 190
Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro
195 200 205
Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr
210 215 220
Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg
225 230 235 240
Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu
245 250 255
Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn
260 265 270
Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile
275 280 285
Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg
290 295 300
Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His
305 310 315 320
Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr
325 330 335
Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile
340 345 350
Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile
355 360 365

<210> 3
<211> 158
5 <212> PRT
<213> Virus del papiloma humano tipo 16

<400> 3

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

<210> 4
15 <211> 98
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano tipo 16

ES 2 416 361 T3

<400> 4

```

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

```

5

<210> 5

<211> 737

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido E1 defectuoso en la preplicación y anclado a la membrana de VPH-16

15

<400> 5

```

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

```

ES 2 416 361 T3

Thr Pro Cys Ser Gln Tyr Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys Ser Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Gly Glu Gly Val Ser Glu Arg His Thr Ile
 195 200 205
 Cys Gln Thr Pro Leu Thr Asn Ile Leu Asn Val Leu Lys Thr Ser Asn
 210 215 220
 Ala Lys Ala Ala Met Leu Ala Lys Phe Lys Glu Leu Tyr Gly Val Ser
 225 230 235 240
 Phe Ser Glu Leu Val Arg Pro Phe Lys Ser Asn Lys Ser Thr Cys Cys
 245 250 255
 Asp Trp Cys Ile Ala Ala Phe Gly Leu Thr Pro Ser Ile Ala Asp Ser
 260 265 270
 Ile Lys Thr Leu Leu Gln Gln Tyr Cys Leu Tyr Leu His Ile Gln Ser
 275 280 285
 Leu Ala Cys Ser Trp Gly Met Val Val Leu Leu Leu Val Arg Tyr Lys
 290 295 300
 Cys Gly Lys Asn Arg Glu Thr Ile Glu Lys Leu Ser Lys Leu Leu
 305 310 315 320
 Cys Val Ser Pro Met Cys Met Met Ile Glu Pro Pro Lys Leu Arg Ser
 325 330 335
 Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Trp Tyr Lys Thr Gly Ile Ser Asn Ile Ser
 340 345 350
 Glu Val Tyr Gly Asp Thr Pro Glu Trp Ile Gln Arg Gln Thr Val Leu
 355 360 365
 Gln His Ser Phe Asn Asp Cys Thr Phe Glu Leu Ser Gln Met Val Gln
 370 375 380
 Trp Ala Tyr Asp Asn Asp Ile Val Asp Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Lys
 385 390 395 400
 Tyr Ala Gln Leu Ala Asp Thr Asn Ser Asn Ala Ser Ala Phe Leu Lys
 405 410 415
 Ser Asn Ser Gln Ala Lys Ile Val Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Arg
 420 425 430
 His Tyr Lys Arg Ala Glu Lys Lys Gln Met Ser Met Ser Gln Trp Ile
 435 440 445
 Lys Tyr Arg Cys Asp Arg Val Asp Asp Gly Gly Asp Trp Lys Gln Ile
 450 455 460
 Val Met Phe Leu Arg Tyr Gln Gly Val Glu Phe Met Ser Phe Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Leu Lys Arg Phe Leu Gln Gly Ile Pro Lys Lys Asn Cys Ile Leu
 485 490 495
 Leu Tyr Gly Ala Ala Asn Thr Asp Lys Ser Leu Phe Gly Met Ser Leu
 500 505 510
 Met Lys Phe Leu Gln Gly Ser Val Ile Cys Phe Val Asn Ser Lys Ser
 515 520 525
 His Phe Trp Leu Gln Pro Leu Ala Asp Ala Lys Ile Gly Met Leu Asp
 530 535 540
 Asp Ala Thr Val Pro Cys Trp Asn Tyr Ile Asp Asp Asn Leu Arg Asn
 545 550 555 560
 Ala Leu Asp Gly Asn Leu Val Ser Met Asp Val Lys His Arg Pro Leu
 565 570 575
 Val Gln Leu Lys Cys Pro Pro Leu Leu Ile Thr Ser Asn Ile Asn Ala
 580 585 590
 Gly Thr Asp Ser Arg Trp Pro Tyr Leu His Asn Arg Leu Val Val Phe
 595 600 605
 Thr Phe Pro Asn Glu Phe Pro Phe Asp Glu Asn Gly Asn Pro Val Tyr
 610 615 620
 Glu Leu Asn Asp Lys Asn Trp Lys Ser Phe Phe Ser Arg Thr Trp Ser
 625 630 635 640
 Arg Leu Ser Leu His Glu Asp Glu Asp Lys Glu Asn Asp Gly Asp Ser
 645 650 655
 Leu Pro Thr Phe Lys Cys Val Ser Gly Gln Asn Thr Asn Thr Leu Tyr
 660 665 670
 Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
 675 680 685
 Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln Arg
 690 695 700
 Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr Ser Gln Ser Gly
 705 710 715 720
 Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg
 725 730 735
 Leu

<211> 746
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido E1 defectuoso en la preplicación y anclado a la membrana de VPH-18

<400> 6

```

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

10

ES 2 416 361 T3

Trp Gly Val Leu Ile Leu Ala Leu Leu Arg Tyr Lys Cys Gly Lys Ser
 305 310 315 320
 Arg Leu Thr Val Ala Lys Gly Leu Ser Thr Leu Leu His Val Pro Glu
 325 330 335
 Thr Cys Met Leu Ile Gln Pro Pro Lys Leu Arg Ser Ser Val Ala Ala
 340 345 350
 Leu Tyr Trp Tyr Arg Thr Gly Ile Ser Asn Ile Ser Glu Val Met Gly
 355 360 365
 Asp Thr Pro Glu Trp Ile Gln Arg Leu Thr Ile Ile Gln His Gly Ile
 370 375 380
 Asp Asp Ser Asn Phe Asp Leu Ser Glu Met Val Gln Trp Ala Phe Asp
 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Thr Asp Glu Ser Asp Met Ala Phe Glu Tyr Ala Leu Leu
 405 410 415
 Ala Asp Ser Asn Ser Asn Ala Ala Ala Phe Leu Lys Ser Asn Cys Gln
 420 425 430
 Ala Lys Tyr Leu Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Lys His Tyr Arg Arg
 435 440 445
 Ala Gln Lys Arg Gln Met Asn Met Ser Gln Trp Ile Arg Phe Arg Cys
 450 455 460
 Ser Lys Ile Asp Glu Gly Gly Asp Trp Arg Pro Ile Val Gln Phe Leu
 465 470 475 480
 Arg Tyr Gln Gln Ile Glu Phe Ile Thr Phe Leu Gly Ala Leu Lys Ser
 485 490 495
 Phe Leu Lys Gly Thr Pro Lys Lys Asn Cys Leu Val Phe Cys Gly Pro
 500 505 510
 Ala Asn Thr Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Met Ser Phe Ile His Phe Ile
 515 520 525
 Gln Gly Ala Val Ile Ser Phe Val Asn Ser Thr Ser His Phe Trp Leu
 530 535 540
 Glu Pro Leu Thr Asp Thr Lys Val Ala Met Leu Asp Asp Ala Thr Thr
 545 550 555 560
 Thr Cys Trp Thr Tyr Phe Asp Thr Tyr Met Arg Asn Ala Leu Asp Gly
 565 570 575
 Asn Pro Ile Ser Ile Asp Arg Lys His Lys Pro Leu Ile Gln Leu Lys
 580 585 590
 Cys Pro Pro Ile Leu Leu Thr Thr Asn Ile His Pro Ala Lys Asp Asn
 595 600 605
 Arg Trp Pro Tyr Leu Glu Ser Arg Ile Thr Val Phe Glu Phe Pro Asn
 610 615 620
 Ala Phe Pro Phe Asp Lys Asn Gly Asn Pro Val Tyr Glu Ile Asn Asp
 625 630 635 640
 Lys Asn Trp Lys Cys Phe Phe Glu Arg Thr Trp Ser Arg Leu Asp Leu
 645 650 655
 His Glu Glu Glu Glu Asp Ala Asp Thr Glu Gly Asn Pro Phe Gly Thr
 660 665 670
 Phe Lys Leu Arg Ala Gly Gln Asn His Arg Pro Leu Gly Leu Ser Ser
 675 680 685
 Thr Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile
 690 695 700
 Gly Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys
 705 710 715 720
 Gly Glu Gln Val Gly Met Ser Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr
 725 730 735
 Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val Arg Ser Leu
 740 745

<210> 7

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido E2 defectuoso en la preplicación y anclado a la membrana de VPH-16

<400> 7

ES 2 416 361 T3

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

<210> 8

5 <211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido E2 defectuoso en la preplicación y anclado a la membrana de VPH-18

<400> 8

ES 2 416 361 T3

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

<210> 9

5 <211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Porción de 59 nucleótidos de las secuencias que codifican E1 de VPH-16 degeneradas para disminuir la homología con la porción de solapamiento en las secuencias que codifican E2 de VPH-16

<400> 9

15 atggtgattc attacctaca ttcaagtgcg tatctgtgca gaacacaaat actttgtga

59

ES 2 416 361 T3

<210> 10
 <211> 2214
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E1 de VPH-16 defectuoso en la replicación y anclado a la membrana degenerada en la porción de 59 nucleótidos que solapa con la secuencia codificante de E2 de VPH-16.

10 <400> 10

```

atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggtct ttcccctctg tttcggtaag    60
tttcctatag ctgatcctgc aggtaccaat ggggaagagg gtacgggatg taatggatgg    120
ttttatgtag aggctgtagt ggaaaaaaaa acaggggatg ctatatacaga tgacgagaac    180
gaaaatgaca gtgatcacag tgaaagatttg gtagatttta tagtaaatga taatgattat    240
ttaacacagc cagaaacaga gacagcacat gcggtgttta ctgcacagga agcaaaaaca    300
catagagatg cagtaacaggt tctaaaacga aagtatttgg gtagtccact tagtgatatt    360
agtggatgtg tagacaataa tattagtcct agattaaaag ctatatgtat agaaaaaca    420
agttagagctg caaaaaggag attatttgaa agcgaagaca gcgggtatgg caatactgaa    480
gtggaaaactc agcagatggt acaggtagaa gggcgccatg agactgaaac accatgtagt    540
cagtatagtg gtggaagtgg ggggtggtgc agtcagtaca gtagtggaag tgggggagag    600
gggtgttagtg aaagacacac tatatgccaa acaccactta caaatathtt aaatgtacta    660
aaaactagta atgcaaaggc agcaatgta gcaaaaatta aagagttata cggggtgagt    720
ttttcagaat tagtaagacc atttaaaagt aataaatcaa cgtggtgcca ttggtgtatt    780
gctgcatttt gacttacacc cagtatagct gacagtataa aaactactatt acaacaatat    840
tgtttatatt tacacattca aagtttagca gttcctatggg gaatggttgt gttactatta    900
gtaagatata aatgtggaaa aaatagagaa acaattgaaa aattgctgtc taaactatta    960
tgtgtgtctc caatgtgtat gatgatagag cctccaaaat tgcgtagtac agcagcagca   1020
ttatatggtg ataaaacagg tatatcaaat attagtgaag tgtatggaga cacgccagaa   1080
tggatacaaa gacaaacagt attacaacat agttttaatg attgtacatt tgaattatca   1140
cagatgggtac aatgggccta cgataatgac atagtagacg atagtgaat tgcatataaa   1200
tatgcacaat tggcagacac taatagtaat gcaagtgctt ttctaaaaag taattcacag   1260
gcaaaaattg taaaggattg tgcaacaatg tgtagacatt ataaacgagc agaaaaaaa   1320
caaatgagta tgagtcaatg gataaaatat agatgtgata gggtagatga tggaggtgat   1380
tggaaagcaaa ttggtatggt ttttaaggtat caaggtgtag agtttatgtc atttttaact   1440
gcattaaaaa gatttttgca aggcatacct aaaaaaaatt gcatattact ataggtgca   1500
gctaacacag ataaatcatt atttggtatg agtttaatga aatttctgca agggctctgta   1560
atatgttttg taaattctaa aagccatttt tggttacaac cattagcaga tgccaaaata   1620
ggtagttag atgatgctac agtgccctgt tggaactata tagatgacaa ttaagaat   1680
gcattggatg gaaatttagt ttctatggat gtaaagcata gaccattggt acaactaaa   1740
tgccctccat tattaattac atctaacatt aatgctggta cagattctag gtggccttat   1800
ttacataata gattggtggt gtttacattt cctaattgagt ttccatttga cgaaaacgga   1860
aatccagtg atgagcttaa tgataagaac tggaaatcct ttttctcaag gacgtggtcc   1920
agattaagtt tgcacgagga cgaggacaag gaaaacgatg gtgattcatt acctacattc   1980
aagtgcgtat ctggtcagaa cacaaatact ttgtacgtac tgctatcggc aggcacgttg   2040
atcgcaacta tgcttatcat ctctctaata acctgctgca agcgggttga taggcccgaa   2100
agtacccaaa ggtccttgag aggtaccgga cgcaacgtat cggtaacgtc gcaaagcggc   2160
aagttcatta gcagttggga gtcgcacaaa tcaggtggag agaccgcct gtga   2214
    
```

15 <210> 11
 <211> 2241
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E1 de VPH-18 defectuoso en la replicación y anclado en la membrana degenerada para disminuir la homología con la secuencia de VPH-16 codificante de E1.

25 <400> 11

ES 2 416 361 T3

```

atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca 60
cccaccggtc aaatccattg gggcgcagac ccagaaggca cagacggaga aggcacgggt 120
tgcaaccgct ggttctacgt acaagctatt gtagacaaga agaccggaga tgtaatttct 180
gacgatgagg acgagaatgc aacagacaca gggtcggata tggttgactt cattgataca 240
caaggaacat tttgtgaaca agccgagcta gaaactgctc aggcattggt ccatgcgagc 300
gaggtccaca atgatgcaca agtgttgcag gttttaaagc ggaagtttgc aggaggcagc 360
acagaaaaca gtccattagg ggaagcggctg gaggtggata cagagtttaag cccaccggtta 420
caagaaatct cttaaataag tgggcagaaa aaggctaaga ggcggctggt tacaatatca 480
gatagtggct acggctgttc tgaggtgga gcaacacaga ttcaggtaac tacaatggc 540
gaacatggcg gcaatgtatg cagtggcggc agtacggagg ctatagacaa cggaggcaca 600
gagggcaaca acagcagtg agacggtaca agcacaata gcaatataga aaatgtaaat 660
ccacaatgta ccatagcaca attaaaagac ttgttaaaag taacaataa acaaggagct 720
atgcttgagc tattcaagga cacatatggg ctatcattta cagatttagt tagaaatttc 780
aagagtgcac aaaccacatg tacagactgg gttacagcta tattcggagt aaaccaaca 840
atcgcagaag gatttaagac tctaatacag ccatttatat tgtatgccca tatacaatgt 900
ctagactgta agtgggggtg attaatatta gccctgttgc gttacaagtg cggtaagagt 960
agactaacag ttgctaaagg ttaagtacg ttgttacacg tacctgaaac ttgcatgtta 1020
attcaaccac ctaagttacg aagttagtgt gctgcactat actggtacag aactggaatt 1080
tctaacataa gcgaggtaat gggtgacaca cctgagtgga ttcagagact tactattata 1140
cagcatggaa tagacgatag caatttcgat ttgtcagaaa tggttcagtg ggcatttgac 1200
aacgagctga cagatgaaag cgatatggca tttgaatacg ccttattagc tgacagcaac 1260
agcaacgagc ctgcattttt aaagagcaat tgccaagcta aatatttaa agactgtgcc 1320
actatgtgca aacactatag gcgtgccag aaacgacaga tgaatatgtc acagtggatt 1380
cgatttaggt gttcaaaaat agacgaaggg ggagactgga gaccaatagt gcaattcctg 1440
cgataccaac aatagaatt cataacattc ttaggagcct tgaatcatt cttaaaagga 1500
acccccaa gaactgttt agtatattgt ggaccagcaa atactgacaa gtcataattc 1560
ggaatgagct ttatacatt tatacagga gcagttatat cattcgtgaa ctccactagt 1620
cacttctggc tggaaaccgtt aacagacact aaggtggcca tgctagacga cgcaacgacc 1680
acgtgctgga catactttga tacctatatg aggaacgcgt tagacggcaa tccaataagt 1740
attgatagaa aacacaaaacc ttaatacag ctttaagtgc cgccaatact actaaccaca 1800
aatatacatc cagcaaagga taatagatgg ccatacttag aaagtagaat aacagtattt 1860
gaattcccaa atgcattccc gttcgataaa aatggcaacc ctgtatacga aataaacgac 1920
aaaaattgga agtgtttctt tgaaagaaca tggtaaggt tagatttaca tgaagaagaa 1980
gaagatgctg atacagaggg taatccattt ggtactttca aattacgagc tggacagaat 2040
cacaggcctc ttggtttatc gagcactagc atagtctaca tcctgattgc agtgtgtctt 2100
ggagggttga tagggatccc cgctttaata tgttgctgca gggggcgttg taacaaaaag 2160
ggagaacaag ttggtatgtc aagaccaggc ctaaagcctg atcttacggg aacatcaaaa 2220
tcctatgtaa ggtcgtctg a

```

- <210> 12
- 5 <211> 1362
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de VPH-16 defectuoso en la replicación y anclado a la membrana
- <400> 12

ES 2 416 361 T3

atggtaccac	aagcgtggt	acttgtccca	ctgcttggt	tctctttatg	ttttggaaaa	60
ttcccaatag	agactctttg	ccaacgttta	aatgtgtgtc	aggacaaaat	actaacacat	120
tatgaaaatg	atagtacaga	cctacgtgac	catatagact	attggaaaca	catgcgctta	180
gcatgtgcta	tttattacaa	ggccagagaa	atgggattta	aacatattaa	ccaccagggtg	240
gtgccaacgc	tggctgtatc	aaagaataaa	gcattacaag	cagctgaact	gcaactaacg	300
ttagaacaa	tatataactc	acaatatagt	aatgaaaagt	ggacattaca	agacgttagc	360
cttgaagtgt	atthtaactgc	accaacagga	tgtataaaaa	aacatggata	tacagtggaa	420
gtgcagttt	atggagacat	atgcaataca	atgcattata	caactggac	acatatatat	480
atthgtgaag	aagcatcagt	aactgtggta	gagggtcaag	ttgactatta	tggtttatat	540
tatgttcag	aaggatacag	aacatatttt	gtgcagttta	aagatgatgc	agaaaaatat	600
agtaaaaata	aagtatggga	agttcatgcg	ggtggtcagg	taatattatg	tcctacatct	660
gtgttttagca	gcaacgaagt	atcctctcct	gaaattatta	ggcagcactt	ggccaaccac	720
cccgcgcgca	cccataccaa	agccgtcgcc	ttgggcaccg	aagaaacaca	gacgactatc	780
cagcgaccga	gatcagagcc	agacaccgga	aaccctgcc	acaccactaa	gttgttgcac	840
agagactcag	tggacagtgc	tccaatcctc	actgcattta	acagctcaca	caaaggacgg	900
attaactgta	atagtaacac	tacaccata	gtacatttaa	aagggtgatgc	taatacttta	960
aaatgtttaa	gatatagatt	taaaaagcat	tgtacattgt	atactgcagt	gtcgtctaca	1020
tggcattgga	caggacataa	tgtaaaacat	aaaagtgcaa	ttgttacact	tacatatgat	1080
agtgaatggc	aacgtgacca	atthttgtct	caagttaaaa	tacaaaaaac	tattacagt	1140
tctactggat	ttatgtctat	atatgttctt	ctctctgctg	gaactttaat	agctttaatg	1200
ttataatat	tcttaataac	gtgctgtaaa	agggtagacc	gtccagagtc	aactcagcgc	1260
agccttaggg	gtactgggag	aatgtttcc	gtgacatcac	agagtggaaa	atthtatctcg	1320
tcttgggaat	ctcataagag	tggaggcgaa	acacgtcttt	ga		1362

<210> 13
 <211> 1362
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de VPH-18 defectuoso en la replicación y anclado a la membrana degenerada para reducir la homología con la secuencia codificante de E2 de VPH-16 nativa.

<400> 13

atggttccct	aggctctcct	gtttgtacc	cttctggtt	ttccattgtg	ttttgggaaa	60
ttccctattc	agacaccgaa	ggaaaccctt	tcggaacgat	taagttgcgt	gcaagataag	120
atcatagacc	actacgagaa	cgacagtaaa	gacatagaca	gccaaataca	gtactggcaa	180
ctaatacgtt	gggcaaatgc	aatattcttt	gcagcaagg	aacatggcat	acagacatta	240
aatcatcagg	tagtcccagc	ctataacatt	tcgaaaagta	aggcacataa	agctgccgag	300
ctccaaatgg	ccctacaagg	ccttgcacaa	agtcgataca	aaaccgagga	ttggactctg	360
caggacacat	gcgaggaact	atggaataca	gaacctactc	actgctttaa	gaaagggtgc	420
caaaccgtac	aagtatattt	cgacggcaac	aaagacaatt	gtatgacctt	tgtagcatgg	480
gacagtgtgt	attatatgac	tgatgcagga	acatgggaca	aaaccgctac	ctgtgtaagt	540
cacaggggat	tgtactacgt	aaaggagggg	tacaacacgt	tttatataga	attcaaaagt	600
gaatgtgaga	agtatgggaa	cacaggtacg	tgggaggtac	atthttgggaa	taatgtcatt	660
gattgtaatg	actctatgtg	cagtaccagt	gacgacacgg	tctccgctac	tcagcttgtt	720
aaacagctac	agcacacccc	ctcaccgtat	tccagcaccg	tgtccgtggg	aaccgcaaag	780
acctacggcc	agacgtcggc	tgctacacga	cctggccact	gtggactcgc	ggagaagcag	840
cattgtggac	ctgtcaacct	acttctcggg	gcagctacac	ctacaggcaa	caacaagaga	900
cgaaaactct	gcagtggtaa	tacgacgcct	ataatacact	tgaagggaga	cagaaacagt	960
ttgaagtgtc	tacggtacag	gttgcgaaaa	catagcgacc	actatagaga	tatatcatcc	1020
acctggcact	ggaccgggtg	aggcaatgaa	aaaacaggaa	tactgactgt	aaacctacat	1080
agcgaaacac	aaagaacaaa	attcttaaat	actgttgcaa	ttccagatag	tgtacaaata	1140
ttggtgggat	acatgacaat	gtatgtatta	ctgagtgcag	gggcctgac	tgccttgatg	1200
ttgataatth	tcctgatgac	atgthgtaga	agagtcaatc	gatcagaacc	tacgcaacac	1260
aatctcagag	ggacagggag	ggagggtgca	gtcactcccc	aaagcgggaa	gatcatatct	1320
tcattgggaat	cacacaagag	tgggggtgag	accagactgt	ga		1362

<210> 14
 <211> 741
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E6 de VPH-18 no oncogénico y anclado a la membrana degenerada para reducir la homología con la secuencia codificante de E1 de VPH-16 nativa.

<400> 14

ES 2 416 361 T3

```

atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggtct ttcccctctg tttcggtaag 60
tttccatag gatctatggc ggcctttgag gatccaacac ggcgacccta caagctacct 120
gatctgtgca cggaactgaa cacttctactg caagacatag aaataacctg tgtatattgt 180
aagacagtat tggaacttac agaggatatt gaatttgcat ttaaagacct atttgtggtg 240
tatcgtgaca gtatacccca tgccgcatgc cataagtgta tagattttta ctctagaatc 300
agagaattaa ggcactattc agactctgtg tacggagaca cattggaaaa actaactaac 360
actgggttat acaatttatt aataagatgc ctgcggtgcc agaaaccgtt gcttagacac 420
cttaatgaaa aacgacgatt tcacaacata gctgggcact atagaggcca gtgccattcg 480
tgctgcaacc gagcacgaca ggaacgactc caacgacgca gggagacaca agtaagatcc 540
tacgtactgc tatcggcagg cacgttgatc gcactaatgc ttatcatctt cctaataacc 600
tgetgcaage gggttgatag gcccgaaagt acccaaaggc ccttgagagg taccggacgc 660
aacgtatcgg taacgtcgca aagcggcaag ttcattagca gttgggagtc gcacaaatca 720
ggtggagaga cccgcctgtg a 741

```

<210> 15
 <211> 585
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E7 de VPH-18 no oncogénico y anclado a la membrana degenerada para reducir la homología con la secuencia que codifica E7 de VPH-16 nativa.

<400> 15

```

atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca 60
cccaccggtc aaatccattg gggcagatct atgcacggac ctaaggcaac actgcaagac 120
attgtattgc atttagagcc ccaaaatgaa attccggttg cacagttaag cgactcagag 180
gaagaaaacg acgagattga cggagttaat catcaacatt taccagcccg acgagctgaa 240
ccacaacgtc acacaatggt gtgtatgtgc tgtaaatgcg aagccagaat tgagctggta 300
gtagagagct cagcagacga ccttcgagca ttccagcagc tatttctgaa caccctgtcc 360
tttgtctgtc cgtggtgtgc atcccagcag ggatctgggt tategagcac tagcatagtc 420
tacatcctga ttgcagtgtg tcttggaggg ttgatagggg tccccgcttt aatatgttgc 480
tgcaagggggc gttgtaacaa aaagggagaa caagtggta tgtcaagacc aggcctaaag 540
cctgatctta cgggaacatc aaaatcctat gtaaggtcgc tctga 585

```

<210> 16
 <211> 34
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de sentido directo para amplificar la secuencia de E2 de VPH-16 a partir de células CaSki.

<400> 16

aaaccgggat ccatggagac tcttgccaa cgtt

34

<210> 17
 30 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Cebador de sentido inverso para aislar la secuencia de E2 de VPH-16 a partir de células CaSki.

<400> 17

aaaccggaat tcaagcttag atctcatat agacataaat ccagtagac

49

<210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Cebador para reensamblar la secuencia SS-E2 muté-TMR de VPH-16.

ES 2 416 361 T3

	<400> 18	
5	aaacccggat ccatggtacc acaagcgctg tta	33
	<210> 19	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador para reensamblar la secuencia SS-E2 muté-TMR de VPH-16	
	<400> 19	
15	tctcttatg ttttgaaaa ttccaatag agactcttg ccaacgtta aat	53
	<210> 20	
	<211> 53	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para reensamblar la secuencia SS-E2 muté-TMR de VPH-16	
25	<400> 20	
	atttaaactg tggcaaagag tctctattgg gaattttcca aaacataaag aga	53
30	<210> 21	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador para reensamblar la secuencia SS-E2 muté-TMR de VPH-16	
	<400> 21	
40	cagtgctac tggattatg tctatatag ttcttctc tgctggaac	49
	<210> 22	
	<211> 49	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para reensamblar la secuencia SS-E2 muté-TMR de VPH-16	
50	<400> 22	
	gttccagcag agagaagaac atatatagac ataaatccag tagacactg	49
	<210> 23	
55	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador para reensamblar la secuencia SS-E2 muté-TMR de VPH-16	
	<400> 23	
	aaaccagat ctcaaagac ggtttcgcc tccactcta tgag	44
65	<210> 24	

ES 2 416 361 T3

	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador para aislar la secuencia de E1 de VPH-16 a partir de células CaSki	
	<400> 24	
10	aaaccggat ccatggctga tctgcaggt acca	34
	<210> 25	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para aislar la secuencia de E1 de VPH-16 a partir de células CaSki	
20	<400> 25	
	aaaccgaat tccattatcg taggccatt gtac	34
	<210> 26	
25	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador para aislar la secuencia de E1 de VPH-16 a partir de células CaSki	
	<400> 26	
35	aaaccggat ccgagacacg ccagaatgga ta	32
	<210> 27	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador para aislar la secuencia de E1 de VPH-16 a partir de células CaSki	
	<400> 27	
45	aaaccgaat tcaagcttag atctcataa tgtgtagta tttgtcctg	50
	<210> 28	
	<211> 88	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para generar la secuencia degenerada de E1	
55	<400> 28	
	aaaccgagat cttcacaag tatttgtgtt ctgaccagat acgcacttga atgtaggtaa	60
	tgaatcacca tcgttttcct tgtcctcg	88
60	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

ES 2 416 361 T3

	<p><223> Cebador para generar la secuencia de E1 de VPH-16 degenerada</p>	
	<p><400> 29</p>	
5	<p>gatgctacag tgccctgttg g</p>	21
	<p><210> 30 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
10	<p><220> <223> Cebador para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMR de VPH-16</p>	
15	<p><400> 30</p>	
	<p>aaaccaagg atccatgga ccgcaagccc tgcta</p>	35
	<p><210> 31 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
20	<p><220> <223> Cebador para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMR de VPH-16</p>	
25	<p><400> 31</p>	
	<p>ttccctctg ttcggaag ttcctatag ctgatcctgc aggtaccaat gg</p>	52
30	<p><210> 32 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Cebador para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMR de VPH-16</p>	
40	<p><400> 32</p>	
	<p>ccattgtac ctgcaggatc agctatagga aactaccga aacagagggg aa</p>	52
	<p><210> 33 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Cebador oTG17563 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1 de VPH-16</p>	
50	<p><400> 33</p>	
	<p>tatctgtca gaacacaaat actttgtacg tactgctatc ggcaggcacg</p>	50
55	<p><210> 34 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
60	<p><220> <223> Cebador oTG17564 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMR de VPH-16</p>	
65	<p><400> 34</p>	
	<p>cgtagcctgcc gatagcagta cgtacaaagt atttggttc tgaccagata</p>	50

ES 2 416 361 T3

5	<210> 35 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador oTG17565 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMR	
	<400> 35	
10	aaaccCAAAG atcttcacag gcgggtctct ccacctgatt tg	42
	<210> 36 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador oTG15315 para reconstituir la secuencia que codifica SS6E1*deg-TMF de VPH-18	
	<400> 36	
20	ggggagatct atgggtctca aggtgaacgt ctc	33
	<210> 37 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador oTG17881 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMF de VPH-18	
	<400> 37	
30	gtgccttctg ggtctgcgcc ccaatggatt tgaccggtg	39
	<210> 38 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador oTG17882 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMF de VPH-18	
	<400> 38	
40	ggtcaaatcc attggggcgc agaccagaa ggcacag	37
	<210> 39 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador oTG17883 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMF de VPH-18	
	<400> 39	
50	cagaatcaca ggcctcttgg ttatcgagc actagcatag tc	42
	<210> 40 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55		
60		
65		

ES 2 416 361 T3

<220>
<223> Cebador oTG17884 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMF de VPH-18

<400> 40

5 gctagtgctc gataaaccaa gaggcctgtg attctgtcc 39

<210> 41
<211> 32
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oTG17885 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E1*deg-TMF de VPH-18

15 <400> 41

gggggcggcc gctcagagcg acctacata gg 32

20 <210> 42
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador de sentido directo oTG17885 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E2*deg-TMR de VPH-18

<400> 42

30 ggggagatct atggttctc aggctctct g 31

<210> 43
<211> 39
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de sentido directo oTG17876 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E2*deg-TMR de VPH-18

40 <400> 43

gttttgggaa attcctatt cagacaccga aggaaaccc 39

<210> 44
45 <211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Cebador de sentido inverso oTG17877 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E2*deg-TMR de VPH-18

<400> 44

55 gtttcctcg gtgtctgaat agggaattc ccaaaacaca atg 43

<210> 45
<211> 39
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de sentido directo oTG17878 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E2*deg-TMR de VPH-18

65 <400> 45

ES 2 416 361 T3

gtgggataca tgacaatgta tgtattactg agtgcaggg 39

<210> 46
<211> 38
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de sentido inverso oTG17879 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E2*deg-TNgt de VPH-18
10 18

<400> 46

ctgcactcag taatacatac attgtcatgt atcccacc 38

15 <210> 47
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador de sentido inverso oTG17880 para reconstituir la secuencia que codifica SS-E2*deg-TMR de VPH-18

25 <400> 47

gggggcggcc gctcacagtc tggctcac 29

30 <210> 48
<211> 83
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Cebador de sentido directo oTG15174 para reconstituir la secuencia que codifica E6*deg de VPH-18

<400> 48

ggggagatct atggcgcgct ttgaggatcc aacacggcga ccctacaagc tacctgatct 60
gtgcacggaa ctgaacactt cac 83

40 <210> 49
<211> 84
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador de sentido inverso oTG15175 para reconstituir la secuencia que codifica E6*deg de VPH-18

<400> 49

50 **gtattggaac ttacagaggt atttgaattt gcatttaaag acctatttgt ggtgtatcgt 60**
gacagtatac cccatgccgc atgc 84

55 <210> 50
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Cebador de sentido directo oTG15176 para reconstituir la secuencia que codifica E6*deg de VPH-18

<400> 50

aggcactatt cagactctgt gtacggagac acattggaaa aactaactaa cactgggta 60
tacaatttat taataagatg cctgc 85

ES 2 416 361 T3

<210> 51
 <211> 72
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de sentido directo oTG15177 para reconstituir la secuencia que codifica E6*deg de VPH-18

 10 <400> 51

ccttaatgaa aaacgacgat ttcacaacat agctggggcac tatagaggcc agtgccattc 60
gtgctgcaac cg 72

 <210> 52
 15 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Cebador de sentido inverso oTG15178 para reconstituir la secuencia que codifica E2*deg de VPH-18

 <400> 52

ggggagatct tacttggtgc tccctgcgtc gttggagtcg ttcctgtcgt gtcggttgc 60
agcacgaatg gcactg 76

 <210> 53
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG15179 para reconstituir la secuencia que codifica E6*deg de VPH-18

 <400> 53

 35 **gttgtgaaat cgtcgttttt cattaagggtg tctaagcaac ggtttctggc accgcaggca 60**
tcttattaat aaattgta 78

 <210> 54
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG15180 para reconstituir la secuencia que codifica E6*deg de VPH-18

 <400> 54

cacagagtct gaatagtgcc ttaattctct gattctagag taaaaatcta tacacttatg 60
gcatgctggca tgggtatac tg 82

 <210> 55
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG15181 para reconstituir la secuencia que codifica E6*deg de VPH-18

 <400> 55

caaatacctc tgtaagttcc aatactgtct tacaatatac acaggttatt tctatgtctt 60
gcagtgaagt gttcagttcc gtgcac 86

ES 2 416 361 T3

<210> 56
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG14773 para reconstituir la secuencia que codifica E7*deg de VPH-18
 <400> 56
 10
aaaccagat ctatgcacgg acctaaggca aactgcaag acattgtatt gcatttagag 60
ccccaaaatg 70

 <210> 57
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG14774 para reconstituir la secuencia que codifica E7*deg de VPH-18
 20
 <400> 57
aatctcgtcg ttttcttctt ctgagtcgct taactgtgca accggaattt cattttgggg 60
ctctaaatgc aataca 76

 <210> 58
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG14775 para reconstituir la secuencia que codifica E7*deg de VPH-18
 30
 <400> 58
actcagagga agaaaacgac gagattgacg gagttaatca tcaacattta ccagcccgcac 60
gagctgaacc acaacg 76

 <210> 59
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG14776 para reconstituir la secuencia que codifica E7*deg de VPH-18
 45
 <400> 59
ctagctcaat tctggettctg catttacagc acatacacia cattgtgtga cgttgtggtt 60
cagctcgtcg ggctgg 76

 <210> 60
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador de sentido directo oTG14777 para reconstituir la secuencia que codifica E7*deg de VPH-18
 55
 <400> 60
taaatgcgaa gccagaattg agctagtagt agagagctca gcagacgacc ttcgagcatt 60
ccagcagcta tttctg 76

 <210> 61

ES 2 416 361 T3

<211> 79
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador de sentido inverso oTG14778 para reconstituir la secuencia que codifica E7*deg de VPH-18

<400> 61

10	aaaccggat ccctgctggg atgcacacca cggacagaca aaggacaggg tgttcagaaa	60
	tagctgctgg aatgctcga	79

<210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> policonector de cebador de sentido directo

20 <400> 62

	cctgcagaag cttccgggg	20
--	----------------------	----

<210> 63
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> policonector de cebador de sentido inverso

30 <400> 63

35	gatccccgg gaagcttctg caggagct	28
----	-------------------------------	----

<210> 64
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Variante de E6 no oncogénica y presentada en membrana de VPH-16 (SS-16E6*-TMF)

45 <400> 64

ES 2 416 361 T3

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

<210> 65
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Variante de E7 no oncogénica y presentada en membrana de VPH-16 (SS-16E7*-TMR)

10

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 1062
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 416 361 T3

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de VPH-33 (secuencia degenerada)

<400> 66

5

atggaggaaa	tatcagcagc	cttgaatgca	gtccaagaga	aaattctaga	tctttacgaa	60
gcagataaaa	ctgatttacc	atctcaaatt	gaacctgga	aattgatacg	catggcctgc	120
gctttattgt	atacagccaa	acagatgggc	ttttcacatt	tatgtcacca	agtggtagct	180
tctttgttag	catccaaaac	caaagcgttt	caagtagcgg	aactacagat	ggcatttagag	240
acattaagta	aatcacagta	tagcacaagc	caatggacgt	tgcaacagac	aagcttagag	300
gtttgcttt	gtgaaccacc	aaaatgtttt	aaaaagcaag	gagaaacagt	aactgtgcaa	360
tatgacaatg	acaaaaaaaa	taccatggac	tatactaact	ggggtgaaat	atacattata	420
gaggaagata	catgtactat	ggttacaggg	aaagtagatt	atatagggat	gtattacata	480
cataactgtg	aaaagggtata	ctttaaatat	tttaaggagg	atgctgcca	atactctaaa	540
acacaaatgt	gggaagtcca	tgtaggtggc	caggttattg	tttgccctac	gtctatatct	600
agcaatcaaa	tatccactac	tgagactgct	gacatacaga	cagacaacga	taaccgacca	660
ccacaagcag	cggcacaacg	acgacgacct	gcagacacta	ctgacaccgc	ccagcccctt	720
acaaaagctgt	tctgtgcaga	ccccgccttg	gataatagaa	cagcacgtac	agcaactaac	780
tgcaaaaata	agcagcggac	tgtgtgtagt	tctaacgctg	caccaatagt	gcatttgaaa	840
ggcgaatcaa	atagcttaaa	gtggttgaga	tacagattaa	aaccttataa	agagttgtac	900
agttctatgt	cttcaacttg	gcactggact	agtgacaaca	aaaatagtaa	aaatggcata	960
gtaaccgtga	catttgtaac	tgaacagcaa	caacaaatgt	tcttgggtac	cgtaaagata	1020
cctcctactg	tgcaagataag	taccggattc	atgaccttat	aa		1062

<210> 67

10 <211> 1326

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de VPH-33 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana (SS-33E2*-TMR) (secuencia degenerada)

<400> 67

atggtaccgc	aagccctgct	attcgtacct	ttattggtct	ttcccctctg	tttcggtaag	60
tttccatag	aggaaatatac	agcacgcttg	aatgcagctc	aagagaaaa	tctagatcct	120
tacgaagcag	ataaaaactga	tttaccatct	caaattgaac	actggaaatt	gatacgcag	180
gcctgctgt	tattgtatac	agccaaacag	atgggctttt	cacatttatg	tcaccaagtg	240
gtaccttctt	tgtagcctac	caaaaacaaa	gcggttcaag	tagcggaaact	acagatggca	300
ttagagacat	taagtaaatac	acagtatagc	acaagccaat	ggacgcttgc	acagacaagc	360
ttagagggtt	ggctttgtga	accaccaaaa	tgttttaaaa	agcaaggaga	aacagtaact	420
gtgcaaatg	acaatgacaa	aaaaaatacc	atggactata	ctaactgggg	tgaaatatac	480
attatagagg	aagatacatg	tactatgggt	acagggaaag	tagattatat	aggtagtat	540
tacatacata	actgtgaaaa	ggtatacttt	aaatatttta	aggaggatgc	tgccaaatac	600
tctaaaacac	aaatgtggga	agtccatgta	ggtggccagg	ttattgtttg	ccctacgtct	660
atatctagca	atcaaatatac	cactactgag	actgctgaca	tacagacaga	caacgataac	720
cgaccaccac	aagcagcggc	caaacgacga	cgacctgcag	acactactga	caccgccag	780
ccccttacia	agctgttctg	tcgagacccc	gccttgata	atagaacagc	acgtacagca	840
actaaactgca	caaataagca	gcgactgtg	tgtagtctta	acgttgacc	aatagtgcac	900
ttgaaaggcg	aatcaaatag	cttaaagtgt	ttgagataca	gattaaaacc	ttataaagag	960
ttgtacagtt	ctatgtcttc	aacttggcac	tggactagtg	acaacaaaa	tagtaaaaat	1020
ggcatagtaa	ccgtgacatt	tgtaactgaa	cagcaacaac	aaatgttctt	gggtaccgta	1080
aagatacctc	ctactgtgca	gataagtacc	ggattcatga	ccttatacgt	actgctatcg	1140
gcaggcacgt	tgatcgcact	aatgcttatac	atcttcttaa	taacctgctg	caagcggggt	1200
gataggcccg	aaagtaccca	aaggtccttg	agaggtaccg	gacgcaacgt	atcggtaacg	1260
tcgcaaagcg	gcaagttcat	tagcagtttg	gagtcgcaca	aatcaggtgg	agagaccgcg	1320
ctgtga						1326

20

<210> 68

<211> 1107

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de VPH-52 defectuoso en la replicación (52degE2*) (secuencia degenerada)

30

<400> 68

ES 2 416 361 T3

```

atggaatcga taccggcagc gttaaacgct gtgcaggaaa agataactcga tctatatgag 60
gctgacagca atgatctaaa cgcacaaatc gagcattgga agttgactcg aatggcttgt 120
gttttgTTTT ataaagcaaa ggaactggga ataactcata taggccatca agtagtgctt 180
ccaatggcag tgtctaaggc aaaggcctgc caagccgcag agcttcaatt ggctttggag 240
gcattgaaca aaactCaata cagtacagat ggctggacct tacagcaaac aagtctagaa 300
atgtggcgtg cagagccaca aaaatacttc aagaagcagc ggtacacaat aacagtccaa 360
tacgataatg ataaaaacaa cactatggat tacacaaatt ggaaggaat ttatttactt 420
ggtagtggtg aatgcacaat tgtagaagga caagtggatt actatgggtt atactattgg 480
tgtgatggag aaaaaatcta tttcgtaaaa tttagtaacg acgcaaagca atattgtgta 540
acaggagtct gggaggtgca cgtgggCGGT caagtaatcg tgtgtccagc atcggtatca 600
agtaacgagg tttctactac agaaacagct gtccacctat gcaccgaaac ctccaagacc 660
tccgcagtgt ccgtgggtgc caaagacaca cacctacaac caccacagaa gcgacgtcga 720
ccagatgtca cagattccag aaacaccaag taccccaaca accttttgcg gggacaacaa 780
tccgttgaca gcactacacg gggactcgta actgccactg agtgactaa taaaggtcg 840
gttgacata caactgtac tgctcctatt attcacctaa agggtagacc caacagcttg 900
aaatgcctaa ggtatagggt aaaaacacat aaaagtttat atgttcaaat ttcactctac 960
tggcattgga cgagttaatga atgtacaaat aataaactag gtattgtaac aataacgtac 1020
agtgatgaga cacagcgtca acagttttta aaaactgtca aaatcccaa taccgtccaa 1080
gttatacaag gtgtcatgtc attgtaa 1107

```

<210> 69
5 <211> 1374
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido E2 de VPH-52 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana (SS-52E2*-TMF) (secuencia degenerada)

<400> 69

```

atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca 60
cccaccggtc aaatccattg ggccgaatcg ataccggcac ggttaaacgc tgtgcaggaa 120
aagatactcg atctatatga ggctgacagc aatgatctaa acgcacaaat cgagcattgg 180
aagttgactc gaatggcttg tgttttgttt tataaagcaa aggaactggg aataactcat 240
ataggccatc aagtagtgcc tccaatggca gtgtctaagg caaaggcctg ccaagccgca 300
gagcttcaat tggctttgga ggcattgaac aaaactcaat acagtacaga tggotggacc 360
ttacagcaaa caagtctaga aatgtggcgt gcagagccac aaaaatactt caagaagcac 420
gggtacacaa taacagtcca atacgataat gataaaaaa acaactatgga ttacacaaat 480
tgaaggaaa tttatttact tggtagtggt gaatgcacaa ttgtagaagg acaagtggat 540
tactatgggt tatactattg gtgtgatgga gaaaaaatct atttcgtaaa atttagtaac 600
gacgcaaagc aatattgtgt aacaggagtc tgggaggtgc acgtggcggt tcaagtaatc 660
gtgtgtccag catcggtatc aagtaacgag gtttctacta cagaaacagc tgtccacctt 720
tgcaccgaaa cctccaagac ctccgcagtg tccgtgggtg ccaaagacac acacctaaa 780
ccaccacaga agcgacgtcg accagatgtc acagattcca gaaacaccaa gtaccccaac 840
aaccttttct ggggacaaca atccgttgac agcactacac ggggactcgt aactgccact 900
gagtgacata ataaaggctg ggttgacat acaacttgta ctgctcctat tattcaccta 960
aagggtgacc ccaacagctt gaaatgccta aggtataggg taaaaacaca taaaagttta 1020
tatgttcaaa tttcatctac gtggcattgg acgagtaatg aatgtacaaa taataaacta 1080
ggatttgtaa caataacgta cagtgatgag acacagcgtc aacagttttt aaaaactgtc 1140
aaaatoccaa ataccgtcca agttatacaa ggtgtcatgt cattgggttt atcgagcaact 1200
agcatagtct acatcctgat tgcagtgtgt ctgggaggtg tgatagggat ccccgcttta 1260
atatgttgct gcagggggcg ttgtaacaaa aagggagaac aagttggtat gtcaagacca 1320
15 ggcctaaagc ctgatcttac gggaaatca aaatcctatg taaggtcgct ctga 1374

```

<210> 70
<211> 441
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido E2 de VPH-33 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana (SS-33E2*-TMR)

<400> 70

```

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

```

ES 2 416 361 T3

```

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

```

<210> 71

<211> 457

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido E2 de VPH-52 defectuoso en la replicación y presentado en la membrana (SS-52E2*-TMF)

<400> 71

ES 2 416 361 T3

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

<210> 72

<211> 36

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oTG18962 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*TMR

10

<400> 72

cccaaaggat ccaccatggt accgcaagcc ctgcta

36

15 <210> 73

ES 2 416 361 T3

<211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador oTG18963 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*TMR
 <400> 73

10 ttcccctctg tttcggaag ttcctatag aggaaatc agcacgctg aa 52
 <210> 74
 <211> 52
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oTG18964 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*TMR

20 <400> 74
 ttcaagcgtg ctgatattc ctctatagga aactaccga aacagagggg aa 52

25 <210> 75
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador oTG18965 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*TMR
 <400> 75

35 gataagtacc ggattcatga cttatacgt actgctatcg gcaggcacg 49
 <210> 76
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador oTG18966 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*TMR
 <400> 76

45 cgtgcctgcc gatagcagta cgtataaggt catgaatccg gtactatc 49
 <210> 77
 <211> 56
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oTG18967 para reconstituir la secuencia que codifica SS-33E2*TMR

55 <400> 77

60 aaaaccccg c atgcgcgcc gcaagctatc acaggcgggt ctctccacct gatttg 56
 <210> 78
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

ES 2 416 361 T3

	<223> Cebador oTG18968 para reconstituir la secuencia que codifica SS-52E2*-TMF	
	<400> 78	
5	aaacccgaga tctaccatgg gtctcaaggt gaacgtc	37
	<210> 79	
	<211> 46	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oTG18969 para reconstituir la secuencia que codifica SS-52E2*-TMF	
15	<400> 79	
	cccaccggtc aaatccattg gggcgaatcg ataccggcac gggttaa	46
	<210> 80	
20	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador oTG18970 para reconstituir la secuencia que codifica SS-52E2*-TMF	
	<400> 80	
30	ttaaccgtgc cggtatcgat tcgcccgaat ggatttgacc ggtggg	46
	<210> 81	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador oTG18971 para reconstituir la secuencia que codifica SS-52E2*-TMF	
	<400> 81	
40	gttatacaag gtgtcatgct attgggttta tcgagcacta gca	43
	<210> 82	
	<211> 43	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador oTG18972 para reconstituir la secuencia que codifica SS-52E2*-TMF	
	<400> 82	
	tgctagtgct cgataaacc aatgacatga cacctgtat aac	43
	<210> 83	
55	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador oTG18973 para reconstituir la secuencia que codifica SS-52E2*-TMF	
	<400> 83	
65	aagcttgcta gccaccggtg gggccgctgc cgctcagagc gaccttacat agg	53

REIVINDICACIONES

1. Vector que comprende por lo menos una primera molécula de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en el que:

- dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico se obtienen respectivamente a partir de una primera y una segunda secuencias de ácido nucleico nativo que presentan un porcentaje de homología de aproximadamente 80% o superior a 80% en una porción de 40 o más nucleótidos continuos, y

- dicha primera molécula de ácido nucleico y/o dicha segunda molécula de ácido nucleico comprendidas en el vector se modifican a fin de reducir dicho porcentaje de homología a menos de 75%; y

en el que dicha primera molécula de ácido nucleico y dicha segunda molécula de ácido nucleico codifican por lo menos el mismo polipéptido obtenido a partir de serotipos de VPH estrechamente relacionados.

2. Vector según la reivindicación 1, en el que el patrón de uso de codones de la primera molécula de ácido nucleico o de la segunda molécula de ácido nucleico, o de la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico se modifica por lo menos en dicha(s) porción/porciones homóloga(s) de 40 o más nucleótidos continuos con el fin de reducir el porcentaje de homología a menos de 75%.

3. Vector según la reivindicación 2, en el que el patrón de uso de codones se modifica en el nivel de los nucleótidos y dichas modificaciones son silenciosas en el nivel de los aminoácidos.

4. Vector según la reivindicación 2 o 3, en el que el patrón de uso de codones se modifica de tal manera que las porciones homólogas entre la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico se limitan a menos de 8, preferentemente menos de 5, nucleótidos consecutivos.

5. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho vector es un vector adenovírico, preferentemente un vector adenovírico defectuoso en la replicación.

6. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho vector es un vector poxvírico, preferentemente obtenido a partir de un virus de la vaccinia seleccionado de entre el grupo constituido por la cepa Copenhagen, la cepa Wyeth, NYVAC y la cepa Ankara modificada (MVA) altamente atenuada.

7. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico se obtienen de manera independiente a partir de un virus del papiloma de alto riesgo seleccionado de entre el grupo constituido por VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68, VPH-70 y VPH-85.

8. Vector según la reivindicación 7, en el que la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico codifican un polipéptido precoz del virus del papiloma seleccionado de entre el grupo constituido por E1, E2, E6 y E7.

9. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho mismo polipéptido obtenido a partir de organismos estrechamente relacionados es un polipéptido E2.

10. Vector según la reivindicación 9, en el que los serotipos de VPH estrechamente relacionados son VPH-16, VPH-18, VPH-33 y/o VPH-52.

11. Vector según la reivindicación 10, en el que dicho vector comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-16, una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-18, una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-33 y una cuarta molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E2 de VPH-52.

12. Vector según la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido E2 de VPH-16 comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID n°: 7, dicho polipéptido E2 de VPH-18 comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID n°: 8, dicho polipéptido E2 de VPH-33 comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID n°: 70 y dicho polipéptido E2 de VPH-52 comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID n°: 71.

13. Vector según la reivindicación 11 o 12, en el que dicha primera molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 12; dicha segunda molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID n°: 13; dicha tercera molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos presentada en la SEC ID n°: 67 y dicha cuarta molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos presentada en la SEC ID n°: 69.

14. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y 10, en el que dicho mismo polipéptido obtenido a partir de

organismos estrechamente relacionados es un polipéptido E6, un polipéptido E7 o ambos polipéptidos E6 y E7.

5 15. Vector según la reivindicación 14, en el que la primera molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido E6 de VPH-16 y la segunda molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido E6 de VPH-18, en el que la segunda molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos presentada en SEC ID nº: 14.

10 16. Vector según la reivindicación 14, en el que la primera molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido E7 de VPH-16 y la segunda molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido E7 de VPH-18, en el que la segunda molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos presentada en SEC ID nº: 15.

15 17. Vector según la reivindicación 15 o 16, en el que dicho vector es un vector de MVA, la primera molécula de ácido nucleico se dispone bajo el control del promotor 7.5K del virus de la vaccinia y la segunda molécula de ácido nucleico se coloca bajo el control del promotor H5R del virus de la vaccinia, y la primera y la segunda moléculas de ácido nucleico están insertadas en la delección III de dicho vector de MVA.

20 18. Vector según la reivindicación 14, en el que dicho vector comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E6 de VPH-16, una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E6 de VPH-18, una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E7 de VPH-16 y una cuarta molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido E7 de VPH-18, en el que dichas primera, segunda, tercera y cuarta moléculas de ácido nucleico no comprenden una porción de 40 o más nucleótidos continuos que presenten un porcentaje de homología de 75% o superior a 75%.

25 19. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos presentada en cualquiera de entre las SEC ID nº: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 66, 67, 68 o 69.

20. Célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 19 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

30 21. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 19, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o la célula hospedadora según la reivindicación 20, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente uno o más adyuvantes adecuados para la administración sistémica o mucosa a humanos, preferentemente un compuesto de imidazoquinolina.

35 22. Utilización de la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 19, del vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, de la célula hospedadora según la reivindicación 20 o de la composición según la reivindicación 21, para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento o a la prevención de enfermedades infecciosas, cánceres o enfermedades de inmunodeficiencia.

40 23. Utilización según la reivindicación 22 para el tratamiento preventivo o curativo de una afección asociada con la infección por un virus del papiloma, tal como una infección persistente, lesiones premalignas y malignas.

45 24. Utilización según la reivindicación 22 o 23, en la que dicha utilización se lleva a cabo según una modalidad terapéutica de sensibilización y refuerzo, y en la que dicho vector o composición se utiliza para sensibilizar o reforzar, o para sensibilizar y reforzar, una respuesta inmunitaria en un individuo.

Figura 2

Figura 2A: E6 VHP16 (a) versus E6 VHP18 (b)

```

a  ATGCACCAAAAGAGAAGCTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAG  50
      |  ||   |||  |||  |||   ||| |||
b  .....ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCCTA  35

a  AAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACATACATGATATAA  100
      |||  |||  |  |  ||| ||  ||  |  |  |  |  |  |  |  |
b  CAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAAGCTGAACACTTCACTGCAAGACATAG  85

a  TATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATAT  150
      |  ||   ||| ||  ||| ||  |  ||   |  ||| |||  |
b  AAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATTGGAAGTTACAGAGGTATTT  135

a  GACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAATCCATA  200
      ||  ||| ||  ||| |||  |  ||  ||| |||  |  |  |  |
b  GAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTATAGAGACAGTATACCCCA  185

a  TGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATA  250
      ||| ||  ||| |||  ||  |  ||| |||  ||| ||  |  |
b  TGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTATTCTAGAATTAGAGAATTAA  235

a  GACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC  300
      ||| |||  |  |  ||| |||  ||| ||  ||  |  |  |  ||
b  GACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGGAAAACTAACTAAC  285

a  AAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACT  350
      |  ||  |  |||  |||  |||  |||  |  ||  |  |  |  |  |
b  ACTGGGTTATACAATTTATTAATAAGGTGCCTGCGGTGCCAGAAACCGTT  335

a  GTGTCCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATA  400
      |  ||  |  ||| ||  ||| ||  |  |||  |  ||| ||  |
b  GAATCCAGCAGAAAAGCTTAGACACCTTAATGAAAACGACGATTTTACA  385

a  ATATAAGGGGTCGGTGGACCGGTGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCA  450
      |  |||  ||  |  |  |  ||  |  ||  ||  |||  |  ||
b  ACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCATTCGTGCTGCAACCGAGCA  435

a  AG.....AACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA  477
      |  |  ||  ||| |||  ||  |  ||
b  CGACAGGAACGACTCCAACGACGCAGAGAAACACAAGTATAA  477
    
```

Figura 2B: VHP16 E6 (a) versus SEC ID n°14 (b)

```

a .....ATGCACCAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGG 40
          |  ||   |||  |||  |||
b .....ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACAC 100

a AGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATA 90
  ||| ||| ||| ||| | | ||| || | || | | | | | | | |
b GGCGACCCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAAGTGAACACTTCACTG 150

a CATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACG 140
  || || ||| || | || | ||| || | || || | | || | | |
b CAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGTAAGACAGTATTGGAACCTAC 200

a TGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATG 190
  ||| ||| ||| ||| ||| || | || | || | || | || | ||
b AGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGACCTATTTGTGGTGTATCGTGACA 250

a GGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT 240
  | | || ||| || | || | ||| || | || | ||| ||| ||| |||
b GTATACCCCATGCCGCATGCCATAAGTGTATAGATTTTACTCTAGAATC 300

a AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACA 290
  || || | || || ||| || | | ||| ||| ||| ||| ||| || |
b AGAGAATTAAGGCACTATTCAGACTCTGTGTACGGAGACACATTGGAAAA 350

a GCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAACCTGTC 340
  | | ||| || | ||| ||| ||| || | || | || | || | || |
b ACTAACTAACACTGGGTTATACAATTTATTAATAAGATGCCTGCGGTGCC 400

a AAAAGCCACTGTGTCTGAAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAA 390
  | || || | || | || | ||| || | ||| || | ||| || |
b AGAAACCGTT.....GCTTAGACACCTTAATGAAAAACGA 435

a AGATTCCATAATATAAGGGTTCGGTGGACCGGTTCGATGTATGTCTTGTG 440
  ||| || || || || | || | | | || | || | || || || ||
b CGATTTCACAAACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCATTTCGTGCTG 485

a C.....AGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA..... 477
  | || || | || ||| | | || || | |
b CAACCGAGCACGACAGGAACGACTCCAACGACGCAGGGAGACACAAGTAA 535
    
```