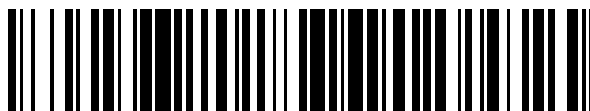


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 901**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/37** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 16/08** (2006.01)

**C07K 14/025** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2000 E 10177363 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2267132**

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

30 Prioridad:

**03.06.1999 FR 9907012**

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

**20.10.2014**

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX (50.0%)  
3, Avenue Victoria  
75100 Paris RP, FR y  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE - INSERM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHOPPIN, JEANNINE;  
BOURGAULT-VILLADA, ISABELLE;  
GUILLE, JEAN-GÉRARD;  
CONNAN, FRANCINE y  
FERRIES, ESTELLE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 509 901 T3

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

## DESCRIPCIÓN

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

5

[0001] La presente invención se refiere a fragmentos proteicos poliepitópicos, tales como los de la proteína E6 de los papilomavirus humanos, su procedimiento de obtención y sus usos, particularmente en el dominio de la vacunación terapéutica o preventiva.

10

[0002] La invención se refiere de una forma más particular al uso de fragmentos poliepitópicos de una proteína determinada para la preparación de medicamentos destinados a la prevención o al tratamiento de patologías en las que dicha proteína es reconocida por el sistema inmunitario celular.

15

[0003] Ventajosamente, dichos fragmentos poliepitópicos son tales que su aminoácido N-terminal corresponde al aminoácido N-terminal del epítipo situado en sentido ascendente de uno o más epítipos de una región poliepitópica de dicha proteína, y su aminoácido C-terminal corresponde al aminoácido C-terminal del epítipo situado en sentido descendente del o de los epítipos anteriormente mencionados de dicha región poliepitópica.

20

[0004] Así, los fragmentos proteicos poliepitópicos anteriormente mencionados de la presente invención corresponden ventajosamente a las regiones poliepitópicas de una proteína determinada, a saber a las regiones que contienen varios epítipos reconocidos por las células T en asociación con las diferentes moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), dichas regiones se seleccionan entre las que tienen la característica de ser degradadas *in vitro* en péptidos más cortos por proteasomas, tales como el proteasoma 20S, cuando el fragmento proteico testado se pone en presencia de dicho proteasoma, particularmente según el método detallado siguiente. El fragmento proteico (aproximadamente 75 µg cuando se trata de un polipéptido de aproximadamente 30 aminoácidos) se incubaba a 37°C con aproximadamente 15µg de proteasoma 20S (Calbiochem Ref 539150, La Jolla, CA, EEUU) en 500 µl del tampón siguiente: 20 mM de Tris-HCl pH8, 0,5 mM de EDTA. Alícuotas de 50 µl son recogidos después del tiempo de incubación de 24 y 48 horas y se analizan por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los productos de digestión de los proteasomas se separan por RP-HPLC (Perkin Elmer) utilizando una columna C18 y un gradiente acetonitrilo (de 0 a 100 % que contiene 0,1 % de ácido trifluoroacético, en 90 mn, índices de elución 0,8 ml/mn). Los productos de división se detectan a 214 nm por un detector de absorción (759A, Applied Biosystems).

25

30

[0005] Ventajosamente, las regiones poliepitópicas definidas anteriormente poseen la característica de contener aminoácidos hidrófobos.

35

[0006] Los diferentes epítipos de la región poliepitópica de la proteína determinada, y que delimitan los fragmentos proteicos poliepitópicos, se seleccionan ventajosamente entre los péptidos;

40

- que se unen a una molécula determinada del CMH, particularmente a una molécula de tipo HLA determinada, y hasta concentraciones de aproximadamente  $10^{-6}$  M a aproximadamente  $10^{-10}$  M en péptido para unas concentraciones de aproximadamente  $10^{-7}$  M en molécula de HLA, particularmente en las condiciones descritas a continuación,

45

- y que forman un complejo estable con esta molécula del CMH, a saber particularmente un complejo en el que dicho péptido permanece unido a dicha molécula durante al menos aproximadamente 3 horas a 37°C.

[0007] A modo de ilustración, los epítipos anteriormente mencionados de la invención se seleccionan de entre los péptidos susceptibles:

50

- por una parte, de asociarse con las moléculas del CMH, particularmente por ejecución del método siguiente:

55

- incubación (particularmente durante aproximadamente 2 horas a 25°C, luego aproximadamente 15 horas a 4°C) del péptido en presencia de moléculas del CMH, provenientes de la lisis de células humanas o animales o purificadas particularmente por cromatografía de afinidad a partir de líneas celulares humanas o animales,

60

- captura de los complejos formados en la etapa precedente en un soporte sólido recubierto de un primer anticuerpo, particularmente monoclonal, que reconoce específicamente las moléculas del CMH en su conformación dependiente de su enlace a dicho péptido,

65

- adición sobre el soporte sólido precedente de un segundo anticuerpo marcado, particularmente por acoplamiento a un marcador radioactivo, enzimático o fluorescente, dichos anticuerpos marcados reconocen específicamente bien las cadenas pesadas del CMH en su conformación dependiente de su enlace al péptido, bien la cadena ligera del CMH o la β-microglobulina que se enlaza específicamente a las diferentes cadenas pesadas del CMH en su conformación anteriormente mencionada,

- detección, después del aclarado del soporte sólido, de la eventual presencia de segundos anticuerpos marcados que quedan fijados sobre el soporte sólido, testimoniando un efecto de asociación entre las moléculas del CMH y el péptido estudiado,

5 - y, por otra parte, de formar un complejo con dichas moléculas del CMH, cuya estabilidad se puede evaluar por ejecución de un método de seguimiento a la vez que el enlace establecido entre el péptido y las moléculas del CMH, este método se realiza ventajosamente según un protocolo idéntico al método precedente, pero en el que la etapa de incubación del péptido en presencia de las moléculas del CMH sobre el soporte sólido recubierto de dicho primer anticuerpo está precedida de una etapa previa de eliminación del péptido libre susceptible de estar presente en el medio reactivo, particularmente por lavado del soporte sólido, dicha etapa de incubación se lleva a cabo (ventajosamente a una temperatura de 37°C) durante tiempos variables de 1h, 3h, 5h, 24h y 48h.az<

15 [0008] Como se ha mencionado anteriormente, los epítomos de la invención deben ser reconocidos por las células T en asociación con las moléculas del CMH y asociarse a estas últimas, particularmente en el marco de la ejecución de la prueba de reconocimiento descrita anteriormente. Esta asociación puede ser baja (detectable a concentraciones en análogos peptídicos del orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M), intermedia (detectable a concentraciones en análogos peptídicos del orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  M) o fuerte (detectable a concentraciones en análogos peptídicos del orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M). Los péptidos asociados a las moléculas del CMH en el marco de la presente invención son preferiblemente susceptibles de unirse durante al menos aproximadamente 3 horas a dichas moléculas del CMH.

20 [0009] La invención tiene de una forma más particular como objetivo los epítomos (también designados péptidos anteriormente y a continuación) tales como los descritos anteriormente y que están caracterizados por el hecho de que se seleccionan de entre los que son susceptibles:

25 - de inducir *in vitro* la citólisis a través de linfocitos T citotóxicos, de células objetivo que presentan en su superficie el péptido anteriormente mencionado asociado a las moléculas del CMH, dichos linfocitos T citotóxicos se recogen ventajosamente de un paciente que sufre una patología en la que está implicado el péptido estudiado,

30 - y de inducir *in vitro* la secreción de citocinas (o interleuquinas) por los linfocitos T citotóxicos anteriormente mencionados, particularmente IL-2, IL-4 o el interferón y.

35 [0010] En su caso, los epítomos anteriormente mencionados son elegidos de entre los que son capaces de inducir *in vitro* la aparición y el crecimiento de linfocitos T citotóxicos a partir de células humanas o animales, particularmente a partir de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), en presencia de factores necesarios para el crecimiento y la diferenciación de las células T citotóxicas.

40 [0011] Los fragmentos proteicos poliepitópicos de la invención se caracterizan además por el hecho de que son susceptibles de contener epítomos CD4 reconocidos por las células T auxiliares en asociación con las moléculas del CMH de clase II, esta propiedad favorece la inducción y el mantenimiento de las células T CD8<sup>+</sup> que reconocen los epítomos comprendidos en dichos fragmentos.

45 [0012] La presente invención se ilustra con ayuda de las figuras 1 y 2, que representan respectivamente las secuencias peptídicas de la proteína E6 y E7 de la cepa 16 de los papilomavirus humanos (HPV 16), así como los fragmentos poliepitópicos de la invención y los epítomos dentro de estos fragmentos.

50 [0013] La invención tiene de una forma más particular como objetivo los fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV y, más particularmente, los de la proteína E6 representada en la figura 1 o por SEC ID N°: 2, de HPV 16, caracterizados por el hecho de que comprenden una secuencia peptídica de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos, esta secuencia peptídica contiene las secuencias de aminoácidos de por lo menos 3 epítomos diferentes y, preferiblemente, de por lo menos 4 epítomos diferentes que se unen de manera estable a las moléculas de HLA de tipo idéntico o diferente, cuando estos epítomos se obtienen por degradación enzimática de dicha secuencia peptídica, particularmente en el proteasoma, de forma que al menos 4 moléculas de HLA de diferentes tipos y, preferiblemente, al menos 5 moléculas de HLA de diferentes tipos, se unen a estos epítomos, estas 4 o 5 moléculas de HLA se seleccionan de entre las de tipo A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44, B51 y B62.

55 [0014] Ventajosamente, los fragmentos poliepitópicos según la invención son tales que el número de aminoácidos de su secuencia peptídica es superior o igual a 17 e inferior o igual a 30.

60 [0015] La invención se refiere de una forma más particular a los fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV definidos anteriormente, caracterizados por el hecho de que comprenden una secuencia peptídica de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos, esta secuencia peptídica contiene las secuencias de aminoácidos de por lo menos 5 epítomos diferentes y, preferiblemente, de por lo menos 6 epítomos diferentes que se unen de manera estable a las moléculas de HLA de tipo idéntico o diferente, cuando estos epítomos se obtienen por degradación enzimática de dicha secuencia peptídica, particularmente en el proteasoma, de manera que al menos 6 moléculas de HLA de diferentes tipos y, preferiblemente, al menos 7 moléculas de HLA de diferentes tipos se ligan a estos epítomos, estas 6 o 7 moléculas de HLA se seleccionan de entre las de tipo A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44 y B51.

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

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

[0018] Está divulgado el fragmento poliepitópico de la proteína E6 de HPV como se ha definido anteriormente, caracterizado por el hecho de que corresponde al fragmento de 30 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 15 y 44 de la secuencia peptídica de la proteína E6 de HPV y caracterizado por la secuencia peptídica SEC ID N°: 4 siguiente:

(15)RPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL(44)

Dicho fragmento contiene 9 epítipos que se unen de manera estable a por lo menos una de las 8 moléculas de HLA de los tipos siguientes: A2, A11, A29, B7, B8, B35, B44 o B51, dichos epítipos son los siguientes:

- (15)RPRKLPQL(22) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B7 o B35,
- (18)KLPQLCTEL(26) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A2,
- (19)LPQLCTEL(26) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B51,
- (21)QLCTELQTTI(30) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A2,
- (24)TELQTTIHDI(33) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A29 o B44,
- (29)TIHDIILRCV(38) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A2,
- (33)IILECVYCK(41) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A11,
- (35)LECVYCKQQL(44) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A29 o B44,
- (37)CVYCKQQL(44) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B8.

[0019] También está divulgado el fragmento poliepitópico de la proteína E6 de HPV como se ha definido arriba, caracterizado por el hecho de que corresponde al fragmento de 17 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 46 y 62, o al fragmento de 22 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 46 y 67 de la secuencia peptídica de la proteína E6 de HPV, este último fragmento se caracteriza por la secuencia peptídica SEC ID N°: 6 siguiente:

(46)RREVDFAFRDLCIVYRDGNPY(67)

Dicho fragmento contiene 6 epítipos que se unen de manera estable a por lo menos una de las 10 moléculas de HLA de los tipos siguientes: A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44 o B51, dichos epítipos son los siguientes:

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

[0020] Está divulgado el fragmento poliepitópico de la proteína E6 de HPV como se ha definido arriba, caracterizado por el hecho de que corresponde al fragmento de 29 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 80 y 108 de la secuencia peptídica de la proteína E6 de HPV, este último fragmento está caracterizado por la secuencia peptídica SEC ID N°: 8 siguiente:

(80)ISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLI(108)

Dicho fragmento contiene 6 epítomos que se unen de manera estable a por lo menos una de las 10 moléculas de HLA de los tipos siguientes: A1, A3, A11, A24, A29, B7, B18, B35, B44 o B51, dichos epítomos son los siguientes:

- 5 - (80)ISEYRHYCY(88) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A1 o B18,
- (81)SEYRHYCY(88) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A29 o B44,
- (87)CYSLYGTTL(95) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24,
- 10 - (94)TLEQQYNK(101) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3 o A11,
- (95)LEQQYNKPL(103) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29 o B44,
- 15 - (101)KPLCDLLI(108) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B7, B35 o B51.

[0021] La invención tiene de una forma más particular como objetivo el fragmento poliepitópico de la proteína E6 de HPV como se ha definido arriba, caracterizado por el hecho de que corresponde al fragmento de 22 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 118 y 139 de la secuencia peptídica de la proteína E6 de HPV, este último fragmento está caracterizado por la secuencia peptídica SEC ID N°: 10 siguiente:

(118)CPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRW(139)

Dicho fragmento contiene 6 epítomos que se unen de manera estable a por lo menos una de las 7 moléculas de HLA de los tipos siguientes: A24, B8, B18, B27, B35, B44 o B51, dichos epítomos son los siguientes:

- 25 - (118)CPEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B8, B18, B35, B51,
- (119)PEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B44,
- 30 - (127)DKKQRFHNI(135) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B8,
- (128)KKQRFHNIR(136) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,
- 35 - (130)QRFHNIRGRW(139) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,
- (131)RFHNIRGRW(139) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24.

[0022] La invención se refiere igualmente a las secuencias peptídicas derivadas de los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados de la proteína E6

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

50 Dichas secuencias derivadas contienen los péptidos o pseudopéptidos que se unen específicamente a la o a las mismas moléculas del CMH que las que se unen a los péptidos contenidos en los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados de los que derivan.

55 [0023] Por secuencia derivada por la introducción de un enlace retro-inverso hay que entender cualquier análogo peptídico de un fragmento anteriormente mencionado, dicho análogo está constituido por una cadena peptídica en la que al menos uno de los residuos, por una parte, está enlazado con al menos un residuo vecino por un enlace -NH-CO- y, por otra parte, es de quiralidad opuesta a la de este mismo residuo aminoácido en la cadena peptídica del péptido original (a saber del fragmento anteriormente mencionado del que deriva).

60 [0024] Por secuencia derivada por la introducción de un enlace retro hay que entender cualquier análogo peptídico de un fragmento anteriormente mencionado, dicho análogo está constituido por una cadena peptídica en la que al menos uno de los residuos está enlazado con al menos un residuo vecino por un enlace -NH-CO-, la quiralidad de la totalidad de los residuos aminoácidos implicados en al menos un enlace -NH-CO- se conserva con respecto a los residuos correspondientes de la cadena peptídica del péptido original.

[0025] Es evidente que los enlaces -CO-NH- y -NH-CO- se deben tomar en cuenta en lo que precede, en el sentido de la cadena peptídica original que va del extremo aminoterminal (N-terminal) al extremo carboxiterminal (C-terminal).

5 [0026] Por "aminoácido proteinogénico" se entiende, en lo que precede, cualquier aminoácido que entra en la constitución de una proteína o de un péptido natural.

10 [0027] Por "aminoácido no proteinogénico" se entiende, por oposición a la definición precedente, cualquier aminoácido que no entra en la constitución de una proteína o de un péptido natural. Se entiende de una forma más particular por "aminoácido no proteinogénico" cualquier aminoácido cuyo carbono que porta la cadena lateral R, a saber el grupo -CHR-, situado entre -CO- y -NH- en la cadena peptídica natural es reemplazado por un motivo que no entra en la constitución de una proteína o de un péptido natural.

15 [0028] La invención tiene de una forma más particular como objetivo las secuencias derivadas tales como las descritas arriba, caracterizadas por el hecho de que por lo menos uno de los enlaces peptídicos -CO-NH- de la cadena peptídica del péptido original es reemplazado por un enlace diferente del enlace -CO-NH-, dicho enlace diferente es particularmente elegido de entre los siguientes:

-CH <sub>2</sub> -NH-	(metileno amino);
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	(carba);
-CO-CH <sub>2</sub> -	(cetometileno);
-CH <sub>2</sub> -O-	(metileno-oxi);
-CHOH-CH <sub>2</sub> -	(hidroxietileno);
-CHOH-CHOH-	(di-hidroxietileno);
-CH=CH-	(E o Z olefina);
-CHCN-NH-	(amino cianometileno);
-S-CH <sub>2</sub> -	(tiometileno);
-CH <sub>2</sub> -S-	(metileno tio);
-CS-NH-	(tioamida);
-PO <sub>2</sub> -NH	(fosfonamida);
-CHOH-	(hidroximetileno);
-NH-CO-NH-	(urea);
<b>-CH—CH-</b>	(oxirano) ;
<b>-C—N-</b>	(tetrazol);
<b>N        N</b>	
<b>      N</b>	
-CH <sub>2</sub> -CO-NH-	(ββ-homologación);
-CHOH-CH <sub>2</sub> -NH-	(hidroxietileno amino);
-CO-NH-NH-	(hidrazino).

20 [0029] La invención tiene también como objetivo las secuencias nucleótidas que codifican para un fragmento polipeptídico de la proteína E6 o para una secuencia peptídica derivada, tal y como se han definido arriba, dichas secuencias nucleótidas salen de la secuencia SEC ID N°: 1 que codifica para la proteína E6.

25 [0030] Por ello, la invención tiene de una forma más particular como objetivo las secuencias nucleótidas definidas arriba, seleccionadas de entre las siguientes:

- la secuencia SEC ID N°: 3, que codifica para el fragmento polipeptídico SEC ID N°: 4 anteriormente mencionado de la proteína E6,

30 - la secuencia SEC ID N°: 7, que codifica para el fragmento polipeptídico SEC ID N°: 8 anteriormente mencionado de la proteína E6,

- la secuencia SEC ID N°: 9, que codifica para el fragmento poliepitópico SEC ID N°: 10 anteriormente mencionado de la proteína E6,

5 [0031] La divulgación tiene también como objetivo cualquier vector, particularmente plásmido, cósmido o fago, que contenga al menos una secuencia nucleótida susodicha colocada bajo el control de los elementos necesarios para la transcripción de dicha secuencia, particularmente bajo el control de un promotor y de un terminador de transcripción.

10 [0032] La divulgación se refiere también a las células huéspedes, particularmente bacterias, virus, levaduras, células eucariotas, transformadas con ayuda de un vector anteriormente mencionado según la divulgación, para integrar de manera estable en su genoma o mantener de manera estable en su citoplasma al menos una secuencia nucleótida según la invención.

15 [0033] La divulgación se refiere también a cualquier vector que incluya uno o varios fragmentos poliepitópicos y/o una o varias secuencias peptídicas derivadas tal y como se ha definido arriba o cualquier vector que incluya una o varias secuencias nucleótidas anteriormente mencionadas, dichos vectores se eligen entre los que son capaces de asegurar una protección de dichos fragmentos o secuencias nucleótidas en el organismo y/o su penetración en las células del organismo.

20 [0034] En el caso de la utilización de fragmentos poliepitópicos y/o de secuencias peptídicas derivadas anteriormente mencionadas, tales vectores se eligen de entre los ácidos grasos (en el marco de la preparación de lipopéptidos), los liposomas, etcétera.

25 [0035] Por ello, la invención tiene de una forma más particular como objetivo cualquier lipopéptido caracterizado por el hecho de que comprende:

- una parte peptídica que incluye uno o varios fragmentos proteicos poliepitópicos elegidos de entre los definidos arriba o cualquier secuencia peptídica derivada de dichos fragmentos, tal y como se ha definido arriba,

30 - y una o varias partes lipófilas, ventajosamente seleccionadas de entre las que incluyen:

- \* una cadena hidrocarbonada en C4 a C20, saturada o insaturada, lineal o ramificada,
- \* o un grupo esteroide, en su caso ligado a la cadena hidrocarbonada susodicha.

35 Dichas partes lipófilas están eventualmente asociadas a un péptido de vector corto (para formar de este modo motivos lipopeptídicos vectores) que incluyen una o más funciones ionizadas a pH fisiológico y una función que permite la fijación covalente de dicha cadena hidrocarbonada y/o de dicho grupo esteroide.

40 [0036] Por parte lipófila, en lo que precede y lo que sigue, se entiende cualquier molécula lipófila, insoluble en agua, que permite, cuando ésta está unida a la parte peptídica definida arriba, un paso intracelular pasivo del lipopéptido obtenido, gracias a las propiedades hidrófobas de dicha molécula. Ventajosamente, el lipopéptido resultante del enlace de la parte lipófila a la parte peptídica, es soluble en agua.

45 [0037] Preferiblemente, la cadena hidrocarbonada de las partes lipófilas, se elige de entre las de:

- el ácido palmítico,
- el ácido oleico,
- 50 - el ácido linoleico,
- el ácido linolénico.

55 [0038] Preferiblemente también, el grupo esteroide de la o de las partes lipófilas, se elige de entre los derivados del colesterol tales como el ácido colest-5-enil-3-oxi acético o el ácido colest-5-enil-3-oxicarbónico.

[0039] La invención tiene de una forma más particular como objetivo cualquier lipopéptido tal y como se ha descrito arriba, caracterizado por el hecho de que la o las partes lipófilas están enlazadas de manera covalente a uno o varios aminoácidos de la parte peptídica.

60 [0040] Ventajosamente, la o las partes lipófilas están enlazadas de manera covalente a la función  $\alpha\text{NH}_2$  o  $\epsilon\text{NH}_2$  de una lisina situada en posición N-terminal o C-terminal de la parte peptídica, o a la función tiol de una cisteína, o a cualquier función amino, alcohol o tiol eventualmente añadida al péptido con un espaciador sencillo.

[0041] Por ello, la invención tiene de una forma más particular como objetivo cualquier lipopéptido tal y como se ha definido arriba, en el cual la o las partes lipófilas se representan por un grupo N<sup>α</sup>-acetil-Lisina N<sup>ε</sup> (palmitoil) (también designado por la abreviación Ac-K(Pam)).

5 [0042] La presente invención tiene también como objetivo micelas o micro agregados de uno o varios lipopéptidos diferentes definidos arriba.

[0043] Ventajosamente, dichas micelas o micro agregados tienen un tamaño inferior a aproximadamente 1µm.

10 [0044] Preferiblemente, las micelas o micro agregados según la invención, son tales como se obtienen por dispersión de dichos lipopéptidos en una solución de ácido acético concentrada a aproximadamente 80%, o cualquier otro solvente capaz de asegurar una dispersión molecular de los lipopéptidos en solución.

15 [0045] En el caso de la utilización de secuencias nucleótidas definidas arriba según la invención, los vectores anteriormente mencionados son elegidos de entre los virus, particularmente los retrovirus, los adenovirus y los virus asociados (AAV *Adeno Associated Virus*).

20 [0046] La invención tiene también como objetivo los anticuerpo dirigidos contra los fragmentos proteicos poliepitópicos o los epítomos o sus secuencias peptídicas derivadas (o análogas) tal y como se han definido arriba, dichos anticuerpos son tal y como se han obtenido por inmunización de un animal con al menos uno de los complejos anteriormente mencionados, dichos anticuerpo son susceptibles de formar un complejo con estos fragmentos poliepitópicos o estos epítomos o sus análogos.

[0047] Los anticuerpo según la invención son los anticuerpos policlonales o monoclonales.

25 [0048] Los anticuerpos policlonales anteriormente mencionados se obtienen por inmunización de un animal con al menos un fragmento proteico poliepitópico o un epítomo o un análogo según la invención, seguido de la recuperación de los anticuerpos deseados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpo de los demás componentes del suero, particularmente por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la que se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, particularmente un fragmento proteico poliepitópico o un epítomo o un análogo según la invención.

[0049] Los anticuerpos monoclonales según la invención se pueden obtener por la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

35 [0050] En primer lugar, se inmuniza un animal, habitualmente un ratón (o células en cultivo en el marco de las inmunizaciones *in vitro*), con un fragmento proteico poliepitópico o un epítomo o un análogo según la invención, contra los cuales los linfocitos B del animal son entonces capaces de producir los anticuerpos. Estos linfocitos productores de anticuerpos son a continuación fusionados con células mielomatosas "inmortales" (particularmente murinas) para dar lugar a los hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células obtenidas de este modo, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir unos anticuerpos particulares y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clones, cada uno llevando a la producción de unos anticuerpos monoclonales cuyas propiedades de reconocimiento frente del fragmento proteico poliepitópico o epítomo o análogo de la invención podrán ser testadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia o con ayuda de un biocaptador. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados se purifican después particularmente según la técnica de cromatografía de afinidad descrita arriba.

[0051] La invención se refiere también a la utilización de uno o varios anticuerpos anteriormente mencionados para la ejecución de un método de diagnóstico *in vitro* de las patologías anteriormente mencionadas.

50 [0052] Por ello, la invención tiene también como objetivo los juegos o kits que incluyen dichos anticuerpos, para la ejecución de un método de diagnóstico tal y como se ha definido arriba.

[0053] La invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas o vacunas, caracterizados por el hecho de que comprenden:

\* a)

- al menos un fragmento poliepitópico de la proteína E6 o E7 tal y como se ha definido arriba,

- y/o al menos una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como se ha definido arriba,

- y/o al menos un vector apropiado, particularmente de los lipopéptidos y/o micelas definidos arriba, que contiene al menos un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6 y/o al menos una secuencia derivada anteriormente mencionada de estos fragmentos,



en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable,

dicho fragmento proteico poliepitópico y/o su secuencia derivada está en su caso asociado a uno o varios epítomos exógenos más reconocidos a través de células T auxiliares (también denominadas epítomos CD4 o T helper), dichos epítomos se eligen particularmente de entre los siguientes:

- el fragmento peptídico delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 830 y 846 de la secuencia peptídica de la toxina tetánica, dicho fragmento responde a la fórmula siguiente: QYIKANSKFIGITELKK,
- la hemaglutinina (Prevost-Blondel et al., 1995, J. Virol., 62, n° 12, pp 8046-8055),
- epítomo PADRE (Alexander et al., 1994, Immunity, 1,751).

\* o b)

- al menos una secuencia nucleótida tal y como está definida arriba, que codifica para un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6,

- y/o al menos una secuencia nucleótida que codifica para una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como se ha definido arriba,

las secuencias nucleótidas anteriormente mencionadas pueden ser utilizadas desnudas, como minigenes,

- y/o al menos un vector apropiado anteriormente mencionado, elegido particularmente de entre los virus tales como se han definido arriba, que contienen al menos una secuencia nucleótida anteriormente mencionada,

en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable,

\* o c)

- anticuerpos definidos arriba, dirigidos contra un fragmento poliepitópico de la proteína E6, y/o contra una secuencia peptídica derivada de estos fragmentos, tales como se han definido arriba, en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

[0054] Ventajosamente las composiciones farmacéuticas, o vacunas, anteriormente mencionados, se presentan bajo una forma administrable por vía subcutánea, particularmente en una proporción de varias inyecciones (ventajosamente 3 inyecciones) de aproximadamente 500 µg del fragmento poliepitópico en forma lipopeptídico, en aproximadamente un mes de intervalo.

[0055] La invención tiene de una forma más particular como objetivo la utilización de fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 definidos arriba, o de secuencias peptídicas derivadas anteriormente mencionadas, o de secuencias nucleótidas definidas por encima, o de anticuerpos anteriormente mencionados, o de lipopéptidos definidos arriba, para la preparación de un medicamento o vacuna destinado a la prevención o al tratamiento de patologías relacionadas con la infección de individuos por los papilomavirus humanos, tales como las neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN), el cáncer invasivo del cuello del útero, las neoplasias vulvares intraepiteliales (VIN).

[0056] La invención se refiere también a los péptidos o epítomos de la proteína E6 de HPV elegidos entre los siguientes:

- (118) CPEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B8, B18, B35, B51.

- (119) PEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B44.

- (127)DKKQRFHNI(135) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B8.

- (128)KKQRFHNI(136) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27.

- (130) QRFHNI(139) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27.

[0057] La divulgación se refiere también a los péptidos o epítomos de la proteína E6 de HPV elegidos de entre los siguientes:

- (19)LPQLCTEL(26) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B51,

- (21)QLCTELQTTI(30) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A2,

- (24)TELQTTIHDI(33) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A29 y B44,

- (33)IILECVYCK(41) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A11,
- (35)LECVYCKQQL(44) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29 y B44,
- 5 - (37)CVYCKQQL(44) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B8,
- (46)RREVDFAFR(55) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,
- (49)VYDFAFRDL(57) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24,
- 10 - (50)YDFAFRDL(57) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, B44,
- (52)FAFRDLCIV(60) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A2, B35, B51,
- 15 - (54)FRDLCIVYR(62) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, A11,
- (81)SEYRHICY(88) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, B44,
- 20 - (87)CYSLYGTTL(95) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A24,
- (94)TLEQQYNK(101) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A3, A11,
- 25 - (95)LEQQYNKPL(103) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo A29, B44,
- (101)KPLCDLLI(108) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B7, B35, B51,

[0058] La divulgación se refiere también a las secuencias peptídicas derivadas de los péptidos anteriormente mencionados, dichas secuencias derivadas o análogos son tal y como se han definido arriba en el marco de las secuencias derivadas de los fragmentos proteicos poliepitópicos anteriormente mencionados.

[0059] La divulgación tiene igualmente como objetivo las secuencias nucleótidas que codifican para los péptidos de la proteína E6 anteriormente mencionados, a saber:

- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 7 y 33 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (3)GDTPTLHEY(11),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 13 y 39 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (5)TPTLHEYML(13),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 43 y 69 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (15)LQPETTDLY(23),
- 45 - la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 46 y 75 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (16)QPETTDLYCY(25),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 133 y 153 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (45)AEPDRAHY(52),
- 50 - la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 136 y 165 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (46)EPDRAHYNIV(55),
- la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 157 y 180 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (53)NIVTFCK(60),
- 55 - la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 235 y 261 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (79)LEDLLMGTL(87),
- 60 - la secuencia delimitada por los nucleótidos situados en las posiciones 265 y 291 de la secuencia SEC ID N°: 2, codificando para (89)IVCPICSQK(97).

[0060] La divulgación tiene igualmente como objetivo cualquier procedimiento de preparación de fragmentos poliepitópicos, de epítomos sencillos (péptidos anteriormente mencionados), o de secuencias derivadas, por síntesis peptídica tradicional en fase líquida o en fase sólida.

5 [0061] En variante, los fragmentos poliepitópicos, epítopos sencillos o secuencias peptídicas derivadas, tal y como se han definido arriba según la invención, se pueden obtener en forma de polipéptidos recombinantes por transformación de células huéspedes apropiadas tales como se han definido arriba con ayuda de vectores que contienen una secuencia nucleótida recombinante tal y como está definido arriba según la invención, y recuperación, en su caso después de purificación, del polipéptido recombinante codificado por dicha secuencia nucleótida y producido por las células huéspedes anteriormente mencionadas.

LISTA DE SECUENCIAS

10 [0062]

<110> BIOVECTOR THERAPEUTICS INSERM  
<120> FRAGMENTOS PROTEICOS POLIEPITÓPICOS DE LA PROTEÍNA E6 O E7 DE HPV, SU OBTENCIÓN Y SUS USOS PARTICULARMENTE EN VACUNACIÓN

15

<130> WOB EPIT 2

<140>

<141>

20

<150> FR 9907012

<151> 1999-06-03

<160> 18

25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 477

30

<212> ADN

<213> Papilomavirus humano

<220>

35

<221> CDS

<222> (1)..(477)

<400> 1

ES 2 509 901 T3

atg cac caa aag aga act gca atg ttt cag gac cca cag gag cga ccc	48
Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro	
1 5 10 15	
aga aag tta cca cag tta tgc aca gag ctg caa aca act ata cat gat	96
Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp	
20 25 30	
ata ata tta gaa tgt gtg tac tgc aag caa cag tta ctg cga cgt gag	144
Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu	
35 40 45	
gta tat gac ttt gct ttt cgg gat tta tgc ata gta tat aga gat ggg	192
Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly	
50 55 60	
aat cca tat gct gta tgt gat aaa tgt tta aag ttt tat tct aaa att	240
Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile	
65 70 75 80	
agt gag tat aga cat tat tgt tat agt ttg tat gga aca aca tta gaa	288
Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu	
85 90 95	
cag caa tac aac aaa ccg ttg tgt gat ttg tta att agg tgt att aac	336
Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn	
100 105 110	
tgt caa aag cca ctg tgt cct gaa gaa aag caa aga cat ctg gac aaa	384
Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys	
115 120 125	
aag caa aga ttc cat aat ata agg ggt cgg tgg acc ggt cga tgt atg	432
Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met	
130 135 140	
tct tgt tgc aga tca tca aga aca cgt aga gaa acc cag ctg tga	477
Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu	

<210> 2  
 <211> 158  
 <212> PRT  
 <213> Papilomavirus humano  
 <400> 2

5

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

<210> 3  
 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(90)

<400> 3  
 cga ccc aga aag tta cca cag tta tgc aca gag ctg caa aca act ata 48  
 Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile  
 1 5 10 15  
 cat gat ata ata tta gaa tgt gtg tac tgc aag caa cag tta 90  
 His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu  
 20 25 30

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 4  
 Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile  
 1 5 10 15  
 His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu  
 20 25 30

ES 2 509 901 T3

<210> 5  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente  
 10  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(66)  
 <400> 5  
 cga cgt gag gta tat gac ttt gct ttt cgg gat tta tgc ata gta tat 48  
 Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr  
 1 5 10 15  
 aga gat ggg aat cca tat 66  
 Arg Asp Gly Asn Pro Tyr  
 20  
 15  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente  
 <400> 6  
 Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr  
 1 5 10 15  
 Arg Asp Gly Asn Pro Tyr  
 20  
 20  
 <210> 7  
 <211> 87  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente  
 35  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(87)  
 <400> 7  
 att agt gag tat aga cat tat tgt tat agt ttg tat gga aca aca tta 48  
 Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu  
 1 5 10 15  
 gaa cag caa tac aac aaa ccg ttg tgt gat ttg tta att 87  
 Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile  
 20 25  
 40  
 <210> 8  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente  
 50

<400> 8

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

<210> 9

5 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

<220>

15 <221> CDS  
 <222> (1)..(66)

<400> 9

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

<210> 10

20 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E6 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

<400> 10

Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His  
 1 5 10 15  
 Asn Ile Arg Gly Arg Trp  
 20

<210> 11

30 <211> 297  
 <212> ADN  
 <213> Papilomavirus humano

<220>

35 <221> CDS  
 <222> (1)..(297)

<400> 11

```

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

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

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

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

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

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

aaa cca taa 297
Lys Pro

```

5 <210> 12  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Papilomavirus humano

```

<400> 12
Met His Gly Asp Thr 5 Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 10 15

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

```

10 <210> 13  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(69)

<400> 13



ES 2 509 901 T3

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

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

<210> 14

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

10 <400> 14

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

Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr  
 20

<210> 15

<211> 51

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

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

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

25 <400> 15

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

aag 51  
 Lys

<210> 16

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

35 <400> 16

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

Lys

<210> 17

<211> 57

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<400> 17

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

tct cag aaa 57  
 Ser Gln Lys

5

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de la secuencia que codifica para E7 de HPV y secuencia peptídica correspondiente

<400> 18

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

Ser Gln Lys

15

## REIVINDICACIONES

1. Fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV humano caracterizados por el hecho de que comprenden:

5 - una secuencia peptídica de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos, preferiblemente con un número de aminoácidos superior o igual a 17 e inferior o igual a 30 para los fragmentos poliepitópicos delimitados por los aminoácidos situados en 118 y 139: (118)CPEEKQRHLDDKKQRFHNIIRGRW(139) (o SEC ID N° :10),

10 - esta secuencia peptídica contiene las secuencias de aminoácidos de por lo menos 3 epítomos diferentes que se enlazan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo idéntico o diferente, cuando estos epítomos se obtienen por degradación enzimática de dicha secuencia peptídica, particularmente en el proteasoma, de manera que al menos 4 moléculas de HLA de diferentes tipos se enlazan a estos epítomos, estas 4 moléculas de HLA se seleccionan de entre las de tipo A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, 88, B18, B27, B35, B44, B51 y B62 para los fragmentos poliepitópicos de la proteína E6.

15 2. Fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV según la reivindicación 1, **caracterizados por el hecho de que** comprenden una secuencia peptídica de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos, esta secuencia peptídica contiene las secuencias de aminoácidos de por lo menos 5 epítomos diferentes que se enlazan de manera estable a las moléculas de HLA de tipo idéntico o diferente, cuando estos epítomos se obtienen por degradación enzimática de dicha secuencia peptídica, particularmente en el proteasoma, de manera que al menos 6 moléculas de HLA de diferentes tipos se enlazan a estos epítomos, estas 6 moléculas de HLA se seleccionan de entre las de tipo A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44 y B51.

20 3. Fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 de HPV según la reivindicación 1 o 2, **caracterizados por el hecho de que** comprenden todos un epítomo que se enlaza a la molécula de HLA de tipo B35, un epítomo que se enlaza a la molécula de HLA de tipo B44 y un epítomo que se enlaza a la molécula de HLA de tipo B51.

25 4. Fragmento poliepitópico de la proteína E6 de HPV según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por el hecho de que** corresponden al fragmento de 22 aminoácidos delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 118 y 139 de la secuencia peptídica de la proteína E6 de HPV, este último fragmento está **caracterizado por** la secuencia peptídica SEC ID N°: 10 siguiente:

(118)CPEEKQRHLDDKKQRFHNIIRGRW(139)

35 dicho fragmento contiene 6 epítomos que se unen de manera estable a por lo menos una de las 7 moléculas de HLA de los siguientes tipos: A24, B8, B18, B27, B35, B44 o B51, dichos epítomos son los siguientes:

- (118)CPEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B8, B18, B35, B51,

40 - (119)PEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B44,

- (127)DKKQRFHNI(135) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B8,

45 - (128)KKQRFHNI(136) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B27,

- (130)QRFHNIIRGRW(139) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B27,

- (131)RFHNIIRGRW(139) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo A24.

50 5. Fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 humana según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados por el hecho de que** corresponden a las secuencias peptídicas derivadas de los fragmentos poliepitópicos definidos en una de las reivindicaciones 1 a 4, particularmente,

55 - por sustitución y/o supresión y/o adición de uno o varios aminoácidos, los fragmentos anteriormente mencionados, y/o

- por modificación de al menos un enlace peptídico -CO-NH- de la cadena peptídica de los fragmentos anteriormente mencionados, particularmente por introducción de un enlace del tipo retro o retro-inverso, y/o

60 - por sustitución de al menos un aminoácido de la cadena peptídica de la secuencia o del fragmento anteriormente mencionados, por un aminoácido no proteinogénico,

65 dichas secuencias derivadas contienen los péptidos o pseudopéptidos que se unen específicamente a la o a las mismas moléculas del CMH que las que se unen a los péptidos contenidos en los fragmentos poliepitópicos anteriormente mencionados de los que derivan.

6. Secuencias nucleótidas que codifican para un fragmento poliepitópico o para una secuencia peptídica derivada según una de las reivindicaciones 1 a 5, dichas secuencias nucleótidas derivan de la secuencia SEC ID N°: 1 que codifica para la proteína E6.

5 7. Secuencias nucleótidas según la reivindicación 6, seleccionadas de entre las siguientes:

- la secuencia SEC ID N°: 3, que codifica para el fragmento poliepitópico SEC ID N°: 4 según la reivindicación 4,
- la secuencia SEC ID N°: 7, que codifica para el fragmento poliepitópico SEC ID N°: 8 según la reivindicación 4,
- la secuencia SEC ID N°: 9, que codifica para el fragmento poliepitópico SEC ID N°: 10 según la reivindicación 4,

8. Anticuerpos, policlonales o monoclonales, dirigidos contra un fragmento poliepitópico o contra una secuencia peptídica derivada según una de las reivindicaciones 1 a 5.

9. Lipopéptido **caracterizado por el hecho de que** comprende:

- una parte peptídica que comprende uno o varios fragmentos proteicos poliepitópicos o una secuencia peptídica derivada de dichos fragmentos, tal y como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 5,

- y una o varias partes lipófilas, tales como las que incluyen:

\* una cadena hidrocarbonada en C4 a C20, saturada o insaturada, lineal o ramificada,

\* o un grupo esteroide, en su caso enlazado a la cadena hidrocarbonada arriba mencionada, dichas partes lipófilas están eventualmente asociadas a un péptido de vector corto que comporta una o varias funciones ionizadas a pH fisiológico, y una función que permite la fijación covalente de dicha cadena hidrocarbonada y/o de dicho grupo esteroide.

10. Composición farmacéutica, o vacuna, **caracterizada por el hecho de que** comprende:

\* a)

- al menos un fragmento poliepitópico de la proteína E6 humana definido en una de las reivindicaciones 1 a 4,
- y/o al menos una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como se define en la reivindicación 5,
- y/o al menos un vector apropiado, particularmente de los lipopéptidos según la reivindicación 9 y/o micelas, que contienen al menos un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6 humana, y/o al menos una secuencia derivada arriba mencionada de estos fragmentos,

en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable, dicho fragmento proteico poliepitópico y/o su secuencia derivada está, en su caso, asociado a uno o más epítomos exógenos reconocidos por las células T auxiliares, tales como el fragmento peptídico delimitado por los aminoácidos situados en las posiciones 830 y 846 de la secuencia peptídica de la toxina tetánica, la hemaglutinina, o el epítomo PADRE,

\* o b)

- al menos una secuencia nucleótida según la reivindicación 6 o 7, que codifica para un fragmento poliepitópico anteriormente mencionado de la proteína E6 humana,
- y/o al menos una secuencia nucleótida que codifica para una secuencia peptídica derivada de este fragmento, tal y como se ha definido anteriormente,
- y/o al menos un vector apropiado anteriormente mencionado, elegido particularmente de entre los virus, que contiene al menos una secuencia nucleótida mencionada arriba,

en asociación con un vehículo fisiológicamente aceptable,

\* o c)

- anticuerpos según la reivindicación 8, dirigidos contra un fragmento poliepitópico de la proteína E6 humana, y/o contra una secuencia peptídica derivada de estos fragmentos, tal y como se ha definido anteriormente.

5 11. Utilización de fragmentos poliepitópicos de la proteína E6 humana definidos en una de las reivindicaciones 1 a 4, o secuencias peptídicas derivadas según la reivindicación 5, o secuencias nucleótidas según la reivindicación 6 o 7, o anticuerpos según la reivindicación 8, o lipopéptidos según la reivindicación 9, para la preparación de un medicamento o vacuna destinada a la prevención o al tratamiento de patologías relacionadas con la infección de individuos por los papilomavirus humanos, tales como las neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN), el cáncer invasivo del cuello del útero, las neoplasias vulvares intraepiteliales (VIN) en el caso de la proteína E6.

12. Epítopos de la proteína E6 del HPV humano elegidos de entre los siguientes:

- 10 - (118)CPEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas de HLA de tipo B8, B18, B35, B51,  
- (119)PEEKQRHL(126) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B44,  
15 - (127)DKKQRFHNI(135) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B8,  
- (128)KKQRFHNIR(136) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27,  
- (130)QRFHNIRGRW(139) se une de manera estable a las moléculas HLA de tipo B27.

Fig 1

Proteina E6 de HPV 16

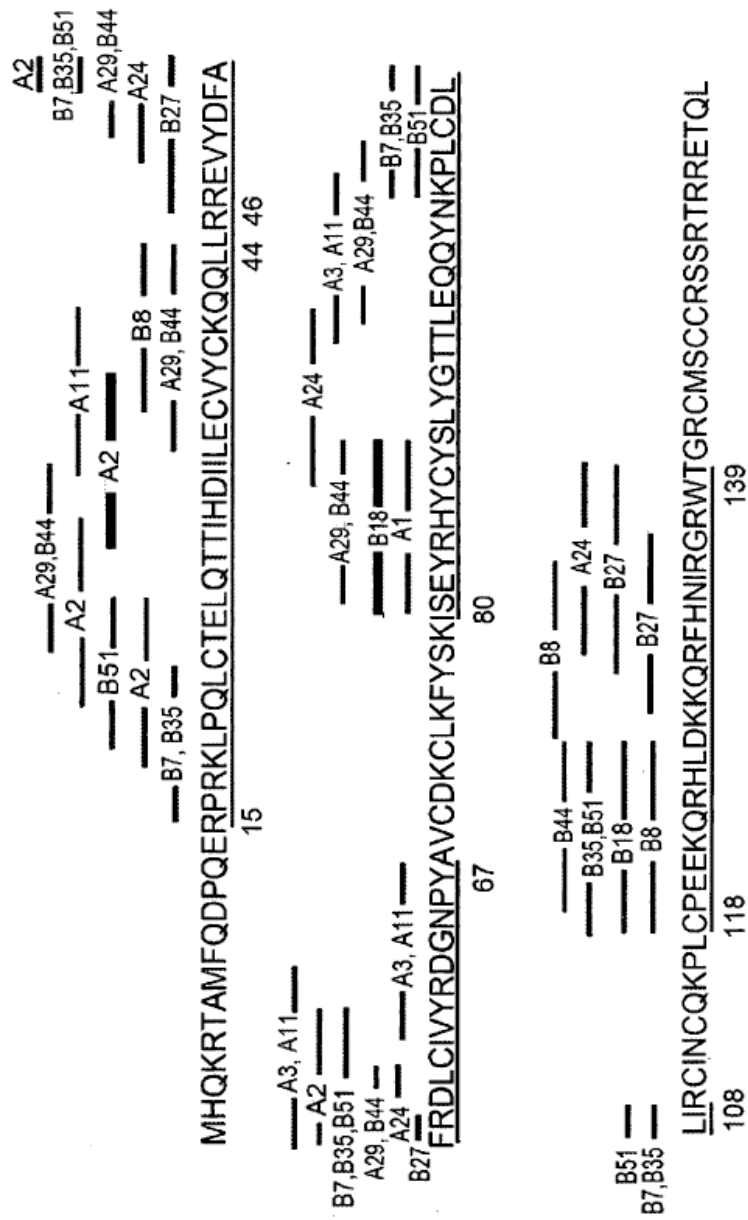


Fig 2

Proteína E7 de HPV 16

