

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 590**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2013 PCT/US2013/022696**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13112549**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2013 E 13740950 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2806889**

54 Título: **Polinucleótidos para el tratamiento de tumores positivos para polipéptidos víricos oncológicos**

30 Prioridad:

24.01.2012 US 201261590089 P

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

14.12.2017

73 Titular/es:

**SANFORD HEALTH (100.0%)
1305 West 18th Street
Sioux Falls, SD 57105, US**

72 Inventor/es:

**LEE, JOHN, H. y
VERMEER, DANIEL, W.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 646 590 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

Polinucleótidos para el tratamiento de tumores positivos para polipéptidos víricos oncogénicos

5 Referencia cruzada con la solicitud relacionada

Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud Provisional N.º 61/590.089, presentada el 24 de enero de 2012.

10 Campo técnico

Las diversas realizaciones divulgadas en la presente memoria se refieren a vacunas víricas. En particular, las diversas realizaciones se refieren a vacunas víricas para el tratamiento del cáncer.

15 Antecedentes

Se sabe que algunos virus, como los virus del papiloma (por ej., HPV16, HPV18), retrovirus (por ej., HTLV, virus de la leucemia felina), herpesvirus (por ej., virus de Epstein Barr) y virus de la hepatitis (por ej., VHB) son una causa conocida de cáncer en seres humanos y otros animales. Si bien las vacunas, que utilizan proteínas de la cubierta del virus o partículas similares a virus, a menudo previenen con éxito la infección, existe la necesidad de terapias que traten la enfermedad establecida y los cánceres asociados a virus.

20 Sumario

En algunas realizaciones, se proporciona un polinucleótido aislado. El polinucleótido aislado puede incluir una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido antigénico, donde el primer polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un primer polipéptido vírico oncogénico, es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria al primer polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente, y no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido antigénico, donde el segundo polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un segundo polipéptido vírico oncogénico, es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria al segundo polipéptido vírico oncogénico en el hospedador inmunocompetente y no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente.

El virus puede ser un virus del papiloma humano. El primer polipéptido vírico oncogénico puede ser E6 y el segundo polipéptido vírico oncogénico puede ser E7.

La primera secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:2 que tiene una mutación específica, por ejemplo, una mutación puntual o deleción en L50, una mutación puntual o deleción en E148, una mutación puntual o deleción en T149, una mutación puntual o deleción en Q150, o una mutación puntual o deleción en L151. La primera secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:29.

La segunda secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:4 que tiene una mutación específica, por ejemplo, una mutación puntual o deleción en H2, una mutación puntual o deleción en C24, una mutación puntual o deleción en E46, o una mutación puntual o deleción en L67. La segunda secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:30.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición. La composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polinucleótido proporcionado en la presente memoria. El polinucleótido puede incluir una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido antigénico, donde el primer polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un primer polipéptido vírico oncogénico, es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria al primer polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente y no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido antigénico, donde el segundo polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un segundo polipéptido vírico oncogénico, es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria al segundo polipéptido vírico oncogénico en el hospedador inmunocompetente, y no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente.

El virus en las composiciones proporcionadas puede ser un virus del papiloma humano. En las composiciones proporcionadas, el primer polipéptido vírico oncogénico puede ser E6 y el segundo polipéptido vírico oncogénico puede ser E7.

La primera secuencia de nucleótidos en las composiciones proporcionadas puede codificar la SEQ ID NO:2 que tiene una mutación específica, por ejemplo, una mutación puntual o deleción en L50, una mutación puntual o

deleción en E148, una mutación puntual o deleción en T149, una mutación puntual o deleción en Q150, o una mutación puntual o deleción en L151. La primera secuencia de nucleótidos en las composiciones proporcionadas puede codificar la SEQ ID NO:29.

5 La segunda secuencia de nucleótidos en las composiciones proporcionadas puede codificar la SEQ ID NO:4 que tiene una mutación específica, por ejemplo, una mutación puntual o deleción en H2, una mutación puntual o deleción en C24, una mutación puntual o deleción en E46 o una mutación puntual o deleción en L67. La segunda secuencia de nucleótidos en las composiciones proporcionadas puede codificar la SEQ ID NO:30.

10 En algunas realizaciones de las composiciones proporcionadas, el vehículo farmacéuticamente aceptable en las composiciones proporcionadas puede ser una envoltura de adenovirus.

15 En algunas realizaciones, se proporciona un método para destruir una célula que expresa un primer polipéptido vírico oncogénico en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto una composición en una cantidad suficiente para iniciar una respuesta inmunitaria contra el primer péptido vírico oncogénico, donde la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polinucleótido proporcionado en la presente memoria y la respuesta inmunitaria es efectiva para causar un efecto citotóxico en la célula. El polinucleótido puede incluir una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido antigénico, donde el primer polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un primer polipéptido vírico oncogénico, es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria al primer polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente, y no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido antigénico, donde el segundo polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un segundo polipéptido vírico oncogénico, es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria al segundo polipéptido vírico oncogénico en el hospedador inmunocompetente, y no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente.

20 En los métodos proporcionados, el virus puede ser un virus del papiloma humano. En los métodos proporcionados, el primer polipéptido vírico oncogénico puede ser E6 y el segundo polipéptido vírico oncogénico puede ser E7.

30 En los métodos proporcionados, la primera secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:2 que tiene una mutación específica, por ejemplo, una mutación puntual o deleción en L50, una mutación puntual o deleción en E148, una mutación puntual o deleción en T149, una mutación puntual o deleción en Q150, o una mutación puntual o deleción en L151. En los métodos proporcionados, la primera secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:29.

35 En los métodos proporcionados, la segunda secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:4 que tiene una mutación específica, por ejemplo, una mutación puntual o deleción en H2, una mutación puntual o deleción en C24, una mutación puntual o deleción en E46 o una mutación puntual o deleción en L67. En los métodos proporcionados, la segunda secuencia de nucleótidos puede codificar la SEQ ID NO:30.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una envoltura de adenovirus.

45 En algunas realizaciones de los métodos proporcionados, la célula puede ser parte de una neoplasia. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados, la célula puede ser parte de una neoplasia maligna.

50 Aunque se describen múltiples realizaciones, otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada, que muestra y describe realizaciones ilustrativas de la invención. En consecuencia, los dibujos y la descripción detallada deben considerarse de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es un esquema que muestra mutaciones en HPV16 E6 y E7.

La Figura 2 muestra la expresión de la proteína supresora de tumores (A), la expresión de HPV16 E6/E7 (B) y la actividad telomerasa relativa (RTA) (C) en células infectadas con un retrovirus de control, un retrovirus que codifica el E6/E7 de tipo silvestre y un retrovirus que codifica un mutante E6/E7.

60 La Figura 3 muestra las características de crecimiento de células infectadas con un retrovirus de control (A), un retrovirus que codifica un E6/E7 de tipo silvestre (B) y un retrovirus que codifica un mutante E6/E7 (C).

65 La Figura 4 muestra la tasa de crecimiento (A) y la expresión de p53 de células infectadas con un retrovirus de control (LXSN), un retrovirus que codifica el E6/E7 de tipo silvestre y un retrovirus que codifica un mutante E6/E7 (B).

La Figura 5 muestra la tasa de crecimiento de células infectadas con un adenovirus de control, un adenovirus que codifica el E6/E7 de tipo silvestre y un adenovirus que codifica un E6/E7 mutante.

5 La Figura 6 muestra la respuesta de interferón gamma de esplenocitos de ratones inmunizados con control de tampón, control de adenovirus (control de vector) o adenovirus que codifica el mutante E6/E7 expuesto al antígeno indicado.

10 La Figura 7 muestra la respuesta de IL-2 de esplenocitos de ratones inmunizados con control de tampón, control de adenovirus (control de vector) o adenovirus que codifica el mutante E6/E7 expuesto al antígeno indicado.

La Figura 8 muestra el crecimiento tumoral HPV+ en ratones vacunados con adenovirus de control (control de vectores), adenovirus que codifica el E6/E7 mutante o adenovirus que codifica el E6/E7 de tipo silvestre. Cada línea indica el crecimiento del tumor en un ratón individual.

15 La Figura 9 muestra la supervivencia en ratones implantados con células cancerosas HPV+ y vacunados con adenovirus de control (Ad5 [E1-, E2b-]-nulo) o adenovirus que codifica el mutante E6/E7 (Ad5 [E1-, E2b-]-E6^Δ/E7^Δ).

Descripción detallada

20 Las diversas realizaciones divulgadas en la presente memoria se refieren a un polipéptido antigénico que inicia una respuesta inmunitaria a un polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente, pero no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente. También se proporcionan en la presente memoria, polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica dicho polipéptido antigénico, composiciones que comprenden dichos polinucleótidos y métodos de uso.

25 Como se usa en la presente memoria, un polipéptido vírico oncogénico es un polipéptido codificado por un genoma vírico que, cuando se expresa en una célula hospedadora, transforma la célula. Los polipéptidos víricos oncogénicos incluyen, sin limitación, el HPV (virus del papiloma humano) 16 E6, HPV16 E7, HPV18 E6, HPV18 E7, el HBV (virus de la hepatitis B) HBXAg, proteína del núcleo del VHC (virus de la hepatitis C), NS5A del VHC, HTLV (virus linfotrópico de linfocitos T humanos) TAX, EBV (virus de Epstein-Barr) EBNA y EBV LMP-1. En algunas realizaciones, un polipéptido vírico oncogénico (por ejemplo, HPV E6) es suficiente para transformar una célula hospedadora sola. En otras realizaciones, un polipéptido vírico oncogénico transforma una célula hospedadora solo en presencia de uno o más cofactores específicos adicionales (por ejemplo, otros oncogenes víricos, mutaciones de genes de la célula hospedadora). Por ejemplo, HPV E6 puede immortalizar células que tienen una mutación en ErbB2, que puede inducir el crecimiento invasivo en algunas células. Cassetti et al. (2004) Vaccine 22(3-4):520-527 describen una vacuna contra el cáncer que comprende un vector de alfavirus que expresa los mutantes E6 y E7 inmunogénicos pero no oncogénicos, en los que el mutante E7 tiene una mutación puntual en C24.

40 Como se usa en la presente memoria, un polipéptido antigénico es un polipéptido que provoca una respuesta inmunitaria cuando está presente en un hospedador inmunocompetente. Tal como se usa en la presente memoria, un hospedador inmunocompetente es un animal capaz de producir una respuesta inmunitaria que da como resultado citotoxicidad (por ejemplo, citotoxicidad mediada por linfocitos T citotóxicos o citotoxicidad mediada por anticuerpos).

45 Los polipéptidos antigénicos proporcionados en la presente memoria se derivan de polipéptidos víricos oncogénicos y contienen al menos una mutación (por ejemplo, una sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos) en comparación con los polipéptidos víricos oncogénicos de los que se derivan. Un polipéptido antigénico proporcionado en la presente memoria contiene al menos una mutación que lo hace no oncogénico en las mismas condiciones en las cuales el polipéptido vírico oncogénico del que se deriva transforma una célula hospedadora. Las mutaciones que hacen que un polipéptido vírico oncogénico se transforme en no oncogénico incluyen aquellas que inactivan funciones oncogénicas, tales como, pero no limitadas a, la interrupción de la unión a proteínas supresoras de tumores, la alteración de los dominios de activación y la alteración de la unión al ADN. Por ejemplo, un polipéptido antigénico derivado de HPV16 E6 puede incluir una mutación que altera un sitio de unión a p53, un sitio de activación de la telomerasa, un dominio de unión a PDZ o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, un polipéptido antigénico derivado de HPV16 E7 puede incluir una mutación que altera un sitio de unión a la proteína Rb, un sitio de unión a Mi2β o una combinación de los mismos.

55 Un polipéptido antigénico proporcionado en la presente memoria tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 72 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o al menos 99,7 % de identidad de secuencia, o de 70 % a 99 %, de 75 % a 99 %, de 80 % a 99 % o de 88 % a 99,9 % de identidad de secuencia) con un polipéptido vírico oncogénico y provoca una respuesta inmunitaria citotóxica a una célula que expresa el polipéptido vírico oncogénico. En algunas realizaciones, un polipéptido antigénico y el polipéptido vírico oncogénico del que se deriva son aproximadamente 95,9 % idénticos, aproximadamente 96,7 % idénticos, aproximadamente 96,9 % idénticos, aproximadamente 97,2 % idénticos, aproximadamente 97,9 % idénticos, aproximadamente 98,6 % idénticos, aproximadamente 99 % idénticos, o aproximadamente 99,3 % idénticos. Ejemplos de polipéptidos antigénicos incluyen SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 y la SEQ ID NO:31. “

“Porcentaje de identidad de secuencia” se refiere al grado de identidad de secuencia entre cualquier secuencia de un polipéptido vírico oncogénico dada, por ejemplo, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, y una secuencia polipeptídica antigénica derivada del mismo. Un polipéptido antigénico generalmente tiene una longitud que está entre el 70 % y el 130 % de la longitud total del polipéptido vírico oncogénico del que se deriva, por ej., 71 %, 74 %, 75 %, 77 %, 80 %, 82 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 93 %, 95 %, 97 %, 99 %, 100 %, 105 %, 110 %, 115 %, 120 % o 130 % de la longitud completa del polipéptido vírico oncogénico del que se deriva. Un porcentaje de identidad para cualquier polipéptido antigénico en relación con el polipéptido vírico oncogénico del que se deriva se puede determinar de la siguiente manera. Un polipéptido vírico oncogénico (por ejemplo, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4) está alineado con una o más secuencias candidatas utilizando el programa informático disponible con el nombre comercial ClustalW (versión 1.83, parámetros predeterminados), que permite alineaciones de ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas que se llevarán a cabo en toda su longitud (alineación global). Chema et al., *Nucleic Acids Res.*, 31 (13): 3497-500 (2003).

ClustalW calcula la mejor coincidencia entre una referencia (por ejemplo, un polipéptido vírico oncogénico) y una o más secuencias candidatas (por ejemplo, un polipéptido antigénico derivado de un polipéptido vírico oncogénico), y las alinea para que se puedan determinar identidades, similitudes y diferencias. Los huecos de uno o más restos se pueden insertar en una secuencia de referencia, una secuencia candidata o ambas, para maximizar las alineaciones de secuencia. Para una alineación rápida por pares de secuencias de ácidos nucleicos, se utilizan los siguientes parámetros predeterminados: tamaño de palabra: 2; tamaño de la ventana: 4; método de puntuación: porcentaje; número de diagonales superiores: 4; y penalización por hueco: 5. Para la alineación de secuencia múltiple de secuencias de ácidos nucleicos, se usan los siguientes parámetros: penalización por apertura de hueco: 10,0; penalización por extensión de hueco: 5,0; y transiciones de peso: sí. Para una alineación rápida por pares de secuencias de proteínas, se usan los siguientes parámetros: tamaño de palabra: 1; tamaño de la ventana: 5; método de puntuación: porcentaje; número de diagonales superiores: 5; penalización por hueco: 3. Para la alineación múltiple de secuencias de proteínas, se usan los siguientes parámetros: matriz de peso: blosum; penalización por apertura de hueco: 10,0; penalización por extensión de hueco: 0,05; huecos hidrófilos: activado; residuos hidrófilos: Gly, Pro, Ser, Asn, Asp, Gln, Glu, Arg y Lys; penalizaciones por huecos específicos por residuo: activado. La salida de ClustalW es una alineación de secuencia que refleja la relación entre secuencias. ClustalW se puede ejecutar, por ejemplo, en el sitio del Instituto Europeo de Bioinformática en la web (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), o descargarlo de, por ejemplo, el sitio Clustal.org en la web (clustal.org/clustal2/).

Para determinar el porcentaje de identidad de un polipéptido antigénico con un polipéptido vírico oncogénico, las secuencias se alinean usando ClustalW, el número de coincidencias idénticas en la alineación se divide por la longitud de la secuencia de referencia y el resultado se multiplica por 100. Se observa que el valor de identidad porcentual puede redondearse al decimal más cercano. Por ejemplo, 78,11, 78,12, 78,13 y 78,14 se redondean a 78,1, mientras que 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 y 78,19 se redondean a 78,2.

Los polinucleótidos proporcionados en la presente memoria (por ejemplo, ID SEC N°: 34) incluyen ADN o ARN de cadena doble o sencilla, lineal o circular, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico proporcionado en la presente memoria. En algunas realizaciones, un polinucleótido proporcionado en la presente memoria incluye más de una secuencia de nucleótidos, cada uno de los cuales codifica un polipéptido antigénico. En algunas realizaciones, un polinucleótido puede comprender un concatámero de secuencias de nucleótidos que codifican el mismo polipéptido antigénico.

Los polinucleótidos proporcionados en la presente memoria también comprenden una o más secuencias de nucleótidos unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico que promueve la expresión de la proteína de la secuencia o secuencias de nucleótidos polipeptídicos antigénicos contenidos en la misma. Tales secuencias incluyen, sin limitación, promotores, potenciadores, secuencias de estabilización de ARN, sitios de entrada interno al ribosoma (IRES) y secuencias de estabilización de proteínas. Los promotores adecuados para su uso en los polinucleótidos proporcionados incluyen, sin limitación, el promotor temprano de SV40, el promotor temprano inmediato de CMV, las repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales, los promotores regulables (por ej., los promotores sensibles a la tetraciclina o IPTG) y el promotor RSV.

Cuando se incluyen una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos antigénicos en un polinucleótido proporcionado en la presente memoria, los polipéptidos expresados a partir de ellos pueden expresarse como proteínas separadas, por ejemplo, mediante promotores separados o mediante el uso de un IRES, o pueden expresarse como proteínas fusionadas.

En algunas realizaciones, un polinucleótido proporcionado en la presente memoria incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta de proteína (por ejemplo, etiqueta myc o etiqueta FLAG) operativamente unida a la secuencia de nucleótidos polipeptídica antigénica de manera que la etiqueta se une al polipéptido antigénico cuando se expresa. Como se usa en la presente memoria, una etiqueta de proteína no está incluida en la secuencia del polipéptido antigénico con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia con el polipéptido vírico oncogénico del que se deriva.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos proporcionados en la presente memoria incluyen secuencias marcadoras que facilitan la detección de los polinucleótidos y/o la expresión de proteínas a partir de los polinucleótidos. En algunas realizaciones, una secuencia marcadora puede codificar una proteína marcadora, tal como un marcador fluorescente (por ejemplo, GFP, RFP o YFP) para facilitar la detección de la expresión de proteínas del polinucleótido. En otras realizaciones, una secuencia marcadora no codifica una proteína, pero se puede detectar usando técnicas de detección de ácido nucleico, como la reacción en cadena de la polimerasa. En algunas realizaciones, se puede usar una secuencia marcadora para alterar una región en un polipéptido vírico oncogénico que contribuye a la actividad oncogénica del polipéptido vírico oncogénico para producir un polipéptido antigénico. En tales casos, la secuencia marcadora no está incluida en la secuencia polipeptídica antigénica con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia con el polipéptido vírico oncogénico del que se deriva, y la secuencia restante puede retener una identidad de secuencia del 100 % con el polipéptido vírico oncogénico del cual se deriva

Un polinucleótido proporcionado en la presente memoria puede producirse usando métodos conocidos, tales como la mutagénesis dirigida al sitio de un polinucleótido que codifica el polipéptido vírico oncogénico (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5).

Cualquiera de los polinucleótidos proporcionados en la presente memoria se puede incorporar a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin limitación, envolturas de virus, vehículos de lípidos catiónicos, células autólogas, vectores plasmídicos y vectores víricos. Cuando un polinucleótido proporcionado en la presente memoria se incorpora a una envoltura de virus, puede incluir una o más secuencias de empaquetado que admitan la incorporación en la envoltura.

En ciertas implementaciones, una composición que comprende un polinucleótido proporcionado en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable se formula para su introducción (por ejemplo, pro vía enteral, transdérmica, intravenosa, subcutánea o intramuscular) en un hospedador inmunocompetente. En uso, la composición se administra a un hospedador inmunocompetente con riesgo de infección por un virus cuyo genoma codifica un polipéptido vírico oncogénico. En algunas realizaciones, la composición se administra a un hospedador inmunocompetente que ya ha sido infectado con dicho virus, o tiene células (por ejemplo, células cancerosas) que expresan un polipéptido vírico oncogénico.

Cuando se administra a un hospedador inmunocompetente, de acuerdo con una realización, una composición proporcionada en la presente memoria provoca una respuesta inmunitaria citotóxica a una célula que expresa un polipéptido vírico oncogénico. En algunas realizaciones, la administración de una composición proporcionada en la presente memoria puede usarse para tratar, mejorar y/o prevenir el cáncer asociado con la expresión de un polipéptido vírico oncogénico en un sujeto. En algunas realizaciones, la administración de una composición proporcionada en la presente memoria puede dar como resultado una reducción en una población de células que expresan un polipéptido vírico oncogénico. Una reducción en una población de células que expresan un polipéptido vírico oncogénico puede medirse usando cualquier medio apropiado, tal como, por ejemplo, midiendo un cambio en el tamaño de un tumor que comprende células que expresan el polipéptido vírico oncogénico, o midiendo un cambio en el número de células cancerosas circulantes que expresan el polipéptido vírico oncogénico. En algunas realizaciones, la administración de una composición proporcionada en la presente memoria a una población de sujetos con un cáncer asociado con la expresión de un polipéptido vírico oncogénico puede dar como resultado una supervivencia promedio más larga en comparación con una población de control que ha sido tratada de manera similar, pero sin la administración de una composición proporcionada en la presente memoria.

En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden usar en combinación con una o más terapias estándar (por ejemplo, radiación, cirugía o quimioterapia) para tratar un sujeto que tiene un cáncer asociado con la expresión de un polipéptido vírico oncogénico. Cuando se usa en combinación con una terapia estándar, las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden administrarse antes, durante o después de la administración de la terapia estándar. En algunas realizaciones, el momento de administración de una composición proporcionada en la presente memoria y/o una terapia estándar se puede ajustar para aumentar la eficacia de una o ambas de la composición o la terapia estándar. Por ejemplo, una composición proporcionada en la presente memoria puede administrarse como una dosis inicial seguida a lo largo del tiempo con dosis de refuerzo adicionales para aumentar la respuesta inmunitaria. En otro ejemplo, una composición proporcionada en la presente memoria puede administrarse antes de la quimioterapia o después de la recuperación inmunitaria de la quimioterapia para aumentar la probabilidad de una respuesta inmunitaria suficiente.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden administrarse en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria citotóxica. La dosis puede ajustarse para obtener una respuesta inmunitaria, pero no inducir una reacción adversa sistémica a un vehículo en la composición. Por ejemplo, cuando se usa un vehículo adenoviral, una dosificación apropiada puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^8 a 10^{12} partículas por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad de dosis y/o el número de dosis pueden ajustarse dependiendo del tipo de secuencias usadas para promover la expresión del polipéptido antigénico codificado, la fuerza de la respuesta inmunitaria en el sujeto o el tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable usado.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden envasar como formulaciones premezcladas o como componentes separados que se pueden mezclar antes de su uso. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden envasar en dosis individuales. En otras realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden envasar en envases que contienen múltiples dosis que se miden antes de la administración. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden formular como un concentrado que se diluye antes de la administración. En todavía otras realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden producirse mezclando los componentes separados antes de la administración. El envasado puede incluir además la documentación apropiada, el etiquetado y similares.

Debe entenderse que los siguientes ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Mutagénesis de HPV16 E6/E7 y construcción vírica

Mutagénesis de HPV16 E6/E7. Se introdujeron seis mutaciones en HPV16 E6 y E7 en un ácido nucleico que codifica el E6/E7 de tipo silvestre como se muestra en la Figura 1 usando mutagénesis dirigida al sitio *in vitro*. Para la mutación designada como L50G, se realizó una mutación de leucina a glicina en la posición 50 en E6 dentro de un dominio de sitio de unión a p53 y activación de la telomerasa. Para la mutación designada PDZ, el dominio de unión de PDZ C-terminal de E6 en los residuos 146-151 se sustituyó con cuatro residuos de alanina. Para la mutación designada como H2P, un residuo de histidina se sustituyó con un residuo de prolina dentro de un sitio de unión de Rb en E7 en la posición 2. Para la mutación designada C24G, un residuo de cisteína se sustituyó con un residuo de glicina dentro de un sitio de unión de Rb en E7 en la posición 24. Para la mutación designada E46A, un residuo de ácido glutámico se cambió a alanina dentro de un sitio de unión a Rb en E7 en la posición 46. Para la mutación designada como L67R, se realizó la mutación de leucina a arginina dentro de una región de unión a Mi2β de E7 en la posición 67. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó en un ácido nucleico que codifica HPV16 E6 y E7 (SEQ ID NO:5) según las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies N.º 200521) usando los cebadores enumerados en la Tabla 1.

Mutación	Cebador directo	Cebador inverso
L50G	GACTATTTTGGCTTTTCGGGATGGA TG (SEQ ID NO:7)	CCCATCTCTATATACTATGCATCCA TC (SEQ ID NO:8)
PDZ	GAACTCGTAGAGCAGCCGCGGCG TA (SEQ ID NO:9)	GTGTATCTCCATGCATGATTACGC CG (SEQ ID NO:10)
H2P	CAGCCGCGGCGTAATCATGCCTG GA (SEQ ID NO:11)	GCAATGTAGGTGTATCTCCAGGCA TG (SEQ ID NO:12)
C24G	CCAGAGACAACTGATCTCTACGG TTA (SEQ ID NO:13)	GCTGTCATTTAATTGCTCATAACCG TA (SEQ ID NO:14)
E46A	GGTCCAGCTGGACAAGCAGCACC GG (SEQ ID NO:15)	GTAATGGGCTCTGTCCGGTGCTGC TT (SEQ ID NO:16)
L67R	CGTGTGTGCTTTGTACGCACCTCC GA (SEQ ID NO:17)	GTGTGACTCTACGCTTCGGAGGTG C (SEQ ID NO:18)

Tabla 1

La construcción mutada se clonó en un vector lanzadera adenoviral Ad5 VQ. La fidelidad de la construcción final se verificó mediante secuenciación directa de ADN.

Construcción vírica. Los vectores Ad5 CMV deficientes en E1 y E2b (vector vacío designado [E1-, E2b-]) que contiene el mutante E6/E7 (designado [E1-, E2b-]mut-E6/E7) y tipo silvestre E6/E7 (designado [E1-, E2b-]wt-E6/E7) fueron construidos y producidos como se describió previamente (Amalfitano et al. (1998) J. Virol. 72(2): 926-33) Brevemente, las secuencias de E6/E7 de tipo silvestre y mutante se subclonaron en la región E1 del vector Ad5[E1-, E2b-] usando un enfoque basado en la recombinación homóloga. El virus deficiente en replicación se propagó en la línea celular de empaquetamiento E.C7, se purificó con CsCl₂ y se tituló. Se determinó el título infeccioso vírico

como unidades formadoras de placa (PFU) en una monocapa de células E.C7. La concentración de partícula vírica (VP) se determinó por disrupción con dodecilsulfato de sodio (SDS) y espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. La relación entre VP y unidades formadoras de placa (PFU) fue de 36,7/1 VP/PFU. El inserto mut-E6/E7 así como wt-E6/E7 se cortó y se ligó a continuación al vector retroviral pLXSN usando los sitios de restricción EcoRI y BamHI. Se generaron partículas de retrovirus en la línea celular Phoenix A de acuerdo con los métodos recomendados (Nolan Lab, Stanford University, California) con polibreno (Sigma H9268) añadido a una concentración final de 8 µg/ml.

Ejemplo 2. Efecto de las mutaciones E6/E7 sobre la oncogénesis

Oncogénesis en una línea celular de epitelio basal alveolar de adenocarcinoma humano. Para determinar si la oncogénesis promovida por E6/E7 mutada, células A549 (línea celular de epitelio basal alveolar de adenocarcinoma humano) se infectaron con un retrovirus que contenía wt-E6/E7 (SEQ ID NO:6), mut-E6/E7 (SEQ ID NO:31), o vector de control, y se clonaron en anillo. Los clones se analizaron mediante transferencia Western. La Figura 2A muestra que la expresión de wt-E6/E7 disminuye la expresión de las proteínas PTPN13, pRb y p53 mientras que los niveles de expresión de PTPN13, pRb y p53 son similares al control en las células que expresan mut-E6/E7. El análisis por PCR de los clones confirmó que mut-E6/E7 se expresaba a niveles similares a wt-E6/E7 (Figura 2B), lo que sugiere que los cambios evidentes por transferencia Western fueron una consecuencia de la función E6/E7 alterada en lugar de los niveles de expresión y confirman una pérdida de función oncogénica en la construcción mut-E6/E7. La actividad telomerasa también se examinó en estos clones. El mut-E6/E7 y el control del vector mostraron una actividad telomerasa relativa (RTA) significativamente menor en comparación con el wt-E6/E7 (Figura 2C). Debido a que wt-E6/E7 induce cambios morfológicos del tipo mesenquimal, también se examinaron las características morfológicas de los clones. La Figura 3 muestra que el control y mut-E6/E7 crecen en colonias ajustadas, mientras que la expresión de wt-E6/E7 induce un cambio mesenquimatoso en la morfología y las células crecen de forma no adherente. En conjunto, estos datos sugieren que, a diferencia de la expresión de wt-E6/E7, la expresión estable de mut-E6/E7 no induce los cambios bioquímicos o morfológicos asociados con la transformación celular.

Transformación en células epiteliales humanas primarias. Para demostrar adicionalmente que mut-E6/E7 no transforma células, se infectaron epitelios de amígdala humanos (HTE) primarios con retrovirus que contenían wt-E6/E7, mut-E6/E7 o vector vacío (LXSN). Las células HTE no infectadas (HTE052) sirvieron como control adicional. La expresión de wt-E6/E7 da como resultado la inmortalización celular. Sin embargo, los HTE que expresan mut-E6/E7 y, al igual que los controles, no se inmortalizaron (Figura 4A). Estos resultados demuestran que la expresión estable de mut-E6/E7, incluso expresada a partir de un retrovirus integrador, no da como resultado la inmortalización celular.

Para determinar si wt-E6/E7 o mut-E6/E7 en una infección por vector vírico adenoviral no replicativo de queratinocitos amigdalinos humanos primarios puede dar como resultado una transformación, se infectaron HTE con [E1-, E2b-] que expresan GFP, [E1-, E2b-]mutE6/E7 o [E1-, E2b-]wt-E6/E7. Wt-E6/E7 fue capaz de inducir la pérdida de p53 (Figura 4B), sin embargo, ni wt-E6/E7 ni mut-E6/E7 pudieron inmortalizar las células epiteliales de la amígdala primaria después de la infección (Figura 5). Para determinar si esto se debió a la pérdida vírica con la replicación, examinamos la persistencia del ADN vírico con el crecimiento celular. Se realizó una Q-PCR y se demostró que, a medida que las células se replicaban, el ADN vírico se perdía a una velocidad similar con todos los insertos, lo que sugiere que los genes víricos no se integraron en el ADN de la célula hospedadora. Por lo tanto, los genes del HPV en el vector adenoviral [E1-, E2b-] no persisten con la división y la expresión transitoria de wt-E6/E7 de un vector adenoviral deficiente en replicación no es suficiente para transformar las células primarias.

Cultivo de células. Se cultivaron células A549 en medio Eagle modificado de Dulbecco (Thermo Fisher N.º SH30022.01) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Thermo Fisher N.º SH3007103). Se aislaron células epiteliales de amígdala humanas (HTE) primarias de la amigdalectomía quirúrgica de pacientes consentidos con aprobación institucional del IRB utilizando técnicas conocidas (Williams et al. (2009) Head Neck. 31(7):911-8). Las HTE primarias fueron mantenidas en medios SFM de queratinocitos (KSFM, Invitrogen N.º 17005-042).

Infección retroviral. Las células HTE y A549 se infectaron con sobrenadante retroviral que contenía wt-E6/E7, mut-E6/E7, o retrovirus de vector vacío y se incubaron a 37 °C con CO₂ 5 % durante la noche. Los medios se aspiraron 24 horas después de la infección y los medios frescos se complementaron con neomicina (RPI N.º G64000) para su selección. Las colonias individuales se clonaron en anillo y se sometieron a selección con 800 µg/ml de neomicina. Los datos que se muestran utilizando clones infectados retroviralmente son representativos de múltiples clones probados. Debido a su densidad de dependencia para el crecimiento celular, las líneas celulares de HTE no se colocaron bajo la selección de antibióticos, sino que se mantuvieron en KSFM hasta la muerte o inmortalización celular.

Se realizó una PCR estándar para analizar el ARNm en líneas celulares estables que expresan LXSN, LXSN wt-E6/E7 o LXSN mut-E6/E7 para validar que los cambios realizados en mutE6/E7 no afectaron a la tasa de transcripción E6/E7. La PCR se realizó usando el cebador directo E6/E7 5'-CAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTA-3' (SEQ ID NO:19) y el cebador inverso E6/E7 5'-GCTTTTTGTCCAGATGTCTTTGC-3' (SEQ ID NO:20), y los niveles de expresión se normalizaron a los niveles de GAPDH usando el cebador directo GAPDH 5'-GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' (SEQ ID NO:21) y el cebador inverso GAPDH 5'-

TGGAAGATGGTGGATTTC-3' (SEQ ID NO:22). Todas las concentraciones del cebador fueron 450 nM. La preincubación fue de 94 °C durante 10 min. Las condiciones de ciclización fueron de 94 °C durante 40 segundos, 55 °C durante 40 segundos y 72 °C durante 1 minuto durante un total de 30 ciclos.

5 *Infeción adenoviral.* Las células epiteliales de amígdala humanas primarias crecidas hasta el 80 % de confluencia se infectaron con [E1-, E2b-]nulo, [E1-, E2b-]wt-E6/E7, [E1-, E2b-]mut-E6/E7 o Ad GFP a un MOI de 100 por 24 horas. El ADN se recogió en los pases 4, 5 y 6 después de la infección. Las células se trataron con tripsina, se enjuagaron y se volvieron a suspender en solución salina tamponada con fosfato 1X. La extracción de ADN se realizó usando el protocolo estándar de columna de centrifugado de tejido animal del DNeasy DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen N.º 69504).

10 *Q-PCR.* Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa para analizar el número de copias de HPV16 usando el conjunto de cebadores de HPV16 5'-TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA-3' (SEQ ID NO:32) y 671 5'-CTTGTCCAGCTGGACCATCTATT-3' (SEQ ID NO:33). Se usó como control un conjunto de cebadores 18S de Applied Biosystems. La reacción de amplificación incluyó SyberGreen Universal Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM (conjunto de cebadores HPV16) o 100 nM (conjunto de cebadores 18S) de cada cebador y un molde de 25 ng. Las condiciones de ciclización fueron de 95 °C durante 10 minutos con 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos utilizando el termociclador Stratagene Mx3000P.

15 *Análisis de transferencia Western.* Se cultivaron líneas celulares estables A549 wt-E6/E7, A549 mut-E6/E7 y células parentales A549 a 80-90 % de confluencia, se enjuagaron con PBS y se recogieron con solución de lisis (Tris HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; Na₃VO₄ 2 mM; NaF 100 mM; NaPPi 10 mM; glicerol 10 %; Triton 1 %; 1X Inhibidores de la proteasa Halt; PMSF 17,4 µg/µl). Las membranas se sedimentaron por centrifugación (10.000 rpm a 4 °C) y se recogieron las proteínas solubles. La proteína total se cuantificó utilizando el kit de ensayo de la proteína BCA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce) y se analizó la proteína total igual mediante transferencia Western. Brevemente, las proteínas se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P), se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5 % (MP Biomedicals) o leche en polvo no grasa y se visualizaron mediante quimioluminiscencia en película o mediante el sistema de bioimagen de UVP (Upland, CA). Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos: FAP-1 (1: 500, Santa Cruz sc15356), p53 (1:500, Calbiochem OP43), pRb (1:250, BD Biosciences 554136) y GAPDH (1: 5000, Ambion N.º Am4300).

Ejemplo 3. Respuesta inmunitaria mediada por células específicas del HPV

35 *Inmunidad mediada por células en respuesta al mutante E6/E7.* Para determinar si las mutaciones en E6/E7, que lo convierten en no oncogénico, alteran la capacidad de establecer una respuesta inmunitaria específica del HPV en el contexto del vector adenoviral [E1-, E2b-] in vitro, se extrajeron los bazos de ratones control e inmunizados y se examinó la capacidad de los esplenocitos para secretar IFN-γ y IL-2 cuando fueron estimulados por E6/E7 o lisados de células inmortalizadas con E6/E7. Las respuestas de inmunidad mediada por células (CMI) se determinaron en ratones control no vacunados y vacunados mediante la evaluación de los números de células secretoras de IFN-γ e IL-2 en esplenocitos recogidos de grupos de ratones individuales usando el análisis inmunospot ligado a enzimas (ELISpot). Como se muestra en las Figuras 6 y 7, las respuestas de CMI se detectaron en ratones inmunizados con Ad5 [E1-, E2b-]mut-E6/E7. Esto se demostró mediante niveles significativamente elevados de células formadoras de manchas (SFC) secretoras de IFN-γ (Figura 6) e IL-2 (Figura 7) inducidas en ratones inmunizados, pero no en ratones control inyectados con solución tampón o Ad5 [E1-, E2b-]nulo. Aunque las respuestas de SFC IL-2 fueron sistemáticamente más bajas que las observadas para IFN-γ, estas estaban significativamente por encima de los valores de control. La especificidad de las respuestas de CMI se demostró por la falta de reactividad cuando los esplenocitos de todos los grupos se expusieron a antígenos irrelevantes HIV-gag o CMV. La presencia de esplenocitos funcionalmente activos en todos los grupos de ratones se verificó mediante respuestas positivas a la concanavalina A (ConA). Estos resultados indican que el mut-E6/E7 no oncogénico es inmunogénico e induce una respuesta inmunitaria E6/E7 específica del HPV en o por encima del nivel inducido por wt-E6/E7 cuando se expresa a partir de un vector adenoviral.

40 *Inmunizaciones en animales.* Todos los estudios en animales se realizaron bajo la aprobación de la revisión institucional de cuidado y uso de los animales. Se inyectaron ratones C57B1/6 macho de 8 a 10 semanas de edad tres veces subcutáneamente a intervalos de 7 días con una solución tampón (N = 4), 10¹⁰ VP Ad5 [E1-, E2b-]nulo o 10¹⁰ VP Ad5 [E1-, E2b-]mut-E6/E7. Una cuarta inmunización 2 semanas después de la tercera inmunización sirvió como inyección de refuerzo adicional. Dos semanas después de la última inyección/inmunización, todos los ratones se sacrificaron y se extrajeron los bazos. Los esplenocitos se aislaron para la prueba ELISpot. Se recogió el suero de cada ratón y se almacenó a -20 °C hasta la prueba.

50 *Cultivo de células.* Células epiteliales de amígdalas de ratón que expresan HPV16 E6, E7, Ras y Luciferasa (mEERL) (Williams et al. (2009) Head. Neck. 31(7): 911-8) se mantuvieron en DMEM complementado con medio F-12 de Hams 22,5 %, FCS inactivado por calor 10 %, 100 U/ml de penicilina, estreptomycin 100 µg/ml, hidrocortisona 0,5 µg/ml, toxina colérica 0,0084 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, insulina 5 µg/ml, tri-yodo-tironina 0,00136 µg/ml de EGF 5 µg/ml.

Preparación del lisado de células HPV+. Se cultivaron células HPV+ (mEERL) en dos matraces T125 hasta la confluencia, después de lo cual se rasparon asépticamente las células de la superficie plástica, se lavaron tres veces con PBS estéril y se volvieron a suspender en 1 ml de PBS estéril. Las células se lisaron mediante congelación-descongelación 3 veces y los residuos celulares se eliminaron por centrifugación. La proteína soluble se llevó a un volumen final de 2 ml con PBS estéril. La presencia de HPV-E7 en el lisado se confirmó mediante análisis de transferencia Western realizado como se describe en otro lugar (Gabitzsch et al. (2009) Immunol. Lett. 122(1): 44-51).

Análisis ELISpot. La producción de IFN- γ e IL-2 específica de HPV16-E6 y E7 de esplenocitos aislados de ratones individuales después de las inmunizaciones se detectó mediante ELISpot como se describe en otra parte (Gabitzsch et al. (2009) Vaccine. 27(46): 6394-8). Brevemente, las células se estimularon con los péptidos HPV16 E6 y E7 (conjuntos completos de péptido 15-mer de cada; JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania). Se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a una concentración de 2×10^5 células/pocillo y se describió como el número de células formadoras de manchas (SFC) por 10^6 células por pocillo. Todos los péptidos E6 se combinaron y se analizaron como un solo grupo. De forma similar, todos los péptidos E7 se combinaron y se probaron como un solo grupo. Cada grupo de péptidos se probó por duplicado. Para probar la especificidad, los esplenocitos se expusieron a un grupo de péptidos gag de VIH y a un grupo de péptidos de citomegalovirus (CMV). Los péptidos se utilizaron a 0,1 μ g de cada péptido/pocillo. Para probar la reactividad al lisado celular de mEERL, se agregaron 25 μ l de lisado para ensayar los pocillos por duplicado. En todos los ensayos ELISpot, las células estimuladas con concanavalina A (ConA) a una concentración de 1 μ g/pocillo sirvieron como controles positivos. Las SFC coloreadas se contaron usando un lector de placas Immunospot ELISpot (Cellular Technology, Shaker Heights, OH) y las respuestas se consideraron positivas si, 1) se detectaban 50 SFC/ 10^6 células después de restar el control negativo o 2) las SFC eran al menos 2 veces mayores que las de los pocillos de control negativo y estaban significativamente elevadas.

Análisis estadístico. Se determinaron las diferencias estadísticamente significativas en la respuesta inmunitaria media entre grupos de animales mediante la prueba *t* de Student con un valor de P de 0,05 o menos considerado como significativo, utilizando GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc.).

Ejemplo 4. Supervivencia en un modelo de tumor HPV+

Para evaluar si una respuesta inmunitaria a mut-E6/E7 no oncogénico se asociaría con quimiorradiación dado que se ha demostrado que es el caso de wt-E6/E7 en un fondo de adenovirus, se utilizó un modelo de ratón de HNSCC asociado a HPV+. Se generaron tumores de HPV+ en ratones de tipo silvestre que luego recibieron inmunización intranasal con adenovirus que expresan mut-E6/E7 (Ad5 [E1-, E2b-]-E^A/E7^A) o control de adenovirus (Ad5 [E1-, E2b -]-nulo) junto con cisplatino y radiación (cisplatino/xrt). Los ratones que recibían solo cisplatino/xrt (datos históricos) o control del vector cisplatino/xrt+[E1-, E2b-] (Ad vacío) tenían un crecimiento y supervivencia a largo plazo similares. Sin embargo, los ratones que recibieron mut-E6/E7 o wt-E6/E7 habían mejorado significativamente la supervivencia. Los ratones mut-E6/E7 mostraron el mejor control general del crecimiento tumoral y la supervivencia (Figuras 8 y 9). Estos datos confirman que mutE6/E7 mejora el aclaramiento *in vivo* relacionado con la inmunidad durante la terapia estándar para el cáncer relacionado con el HPV.

Cultivo de células. Las mEERL se mantuvieron como se describe en el Ejemplo 3.

Preparación de células HPV+. Se cultivaron células HPV+ (mEERL) en un único matraz T125 hasta confluencia, después de lo cual se rasparon las células de la superficie plástica y se lavaron.

Modelos de tumores. Se obtuvieron ratones C57B1J/6 machos de Jackson Labs y se mantuvieron por Sanford Research LARF de acuerdo con las directrices del USDA. Todos los experimentos fueron aprobados por Sanford Research IACUC y se realizaron dentro de las directrices institucionales. Brevemente, usando una aguja de calibre 23, se implantaron 1×10^6 células mEERL subcutáneamente en el flanco posterior derecho de los ratones. Después de que se desarrollaran tumores palpables, los días 7, 14 y 21, los ratones recibieron por vía intranasal 10^{10} partículas víricas de control de adenovirus (Ad5 [E1-, E2b-]-nulo) o adenovirus que codifica mut-E6/E7 (Ad5 [E1-, E2b-]-E^A/E7^A). El cisplatino se disolvió en cloruro de sodio al 0,9 % bacteriostático (Hospira Inc. Lake Forest, IL) a 20 mg/m² y se administró por vía intraperitoneal a los 13, 20 y 27 días después de la implantación del tumor. Los ratones se trataron con radioterapia de rayos X 8Gy (RadSource RS2000 irradiator, Brentwood, TN) simultáneamente con el tratamiento con cisplatino. El crecimiento de los tumores se controló semanalmente usando medidas de calibre y el volumen del tumor calculado usando la siguiente fórmula, volumen = (ancho²)(profundidad). Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron 1,5 cm en cualquier dimensión, el animal se volvió demacrado o demostró deterioro funcional de la pierna. Se siguió la supervivencia a largo plazo durante más de 70 días.

Ejemplo 5. Otros polipéptidos víricos oncogénicos.

El enfoque descrito en los Ejemplos 1-4 puede usarse para producir polipéptidos derivados de otros polipéptidos víricos oncogénicos que son eficaces para iniciar una respuesta inmunitaria contra el respectivo polipéptido vírico

oncogénico.

En un ejemplo, uno o ambos de los oncogenes del EBV LMP y EBNA se alteran para que no sean oncogénicos. Tales oncogenes del EBV alterados se usan como terapia, solos o en combinación con cisplatino y/o radiación, para el cáncer nasofaríngeo.

En otro ejemplo, un oncogén del HPV se altera para tratar el sarcoma de Kaposi.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> Sanford Research/USD

<120> Polinucleótidos para el tratamiento de tumores positivos para polipéptidos víricos oncogénicos

15

<130> 425909.000003

<150> 61/509.089

<151> 24-01-2012

20

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1

<211> 456

<212> ADN

<213> Papilomavirus humano de tipo 16

30

<400> 1

```

atgtttcagg acccacagga gcgaccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gaggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtttgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgta      300
attagtgta ttaactgtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaagcaaa gattccataa tataaggggt cgggtggaccg gtcgatgtat gtcttgttgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgtaa      456

```

35

<210> 2

<211> 151

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano de tipo 16

<400> 2

ES 2 646 590 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150

5 <210> 3
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Papilomavirus humano de tipo 16

10 <400> 3

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgaacc agagacaact 60
 gatctctact gttatgagca attaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120
 ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180
 tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240
 gacctgtaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accataa 297

15 <210> 4
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano de tipo 16

ES 2 646 590 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> 753
 <212> ADN
 <213> Papilomavirus humano de tipo 16

10

<400> 5

```

atgtttcagg acccacagga gcgaccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gaggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtttgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgta      300
attaggtgta ttaactgtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cggtggaaccg gtcgatgtat gtcttgttgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgtaaatgc atggagatac acctacattg      480
catgaatata tgttagattt gcaaccagag acaactgata tctactgtta tgagcaatta      540
aatgacagct cagaggagga ggatgaaata gatgggtccag ctggacaagc agaaccggac      600
agagcccatt acaatattgt aaccttttgt tgcaagtgtg actctacgct tcggttgtgc      660
gtacaaagca cacacgtaga cattcgtact ttggaagacc tgттаatggg cacactagga      720
attgtgtgcc ccatctgttc tcagaaacca taa                                     753
    
```

ES 2 646 590 T3

<210> 6
<211> 249
<212> PRT
<213> Papilomavirus humano de tipo 16

5

<400> 6

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

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

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

ES 2 646 590 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
245

<210> 7
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
gactatttg cttttcgga tggatg

26

ES 2 646 590 T3

5	<210> 8 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 8 cccatctcta tatactatgc atccatc gactattttg ctttcggga tggatg	27
	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 9 gaactcgtag agcagccgcg gcgta gactattttg ctttcggga tggatg	25
	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<400> 10 gtgtatctcc atgcatgatt acgccg	26
	<210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 11 cagccgcggc gtaatcatgc ctgga	25
	<210> 12 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 12 gcaatgtagg tgtatctcca ggcgatg	26
55	<210> 13 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador	
65	<400> 13 ccagagacia ctgatctcta cggta	26

ES 2 646 590 T3

5	<210> 14 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 14 gctgtcattt aattgctcat aaccgta	27
15	<210> 15 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
20	<400> 15 ggtccagctg gacaagcagc accgg	25
25	<210> 16 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
30	<400> 16 gtaatgggct ctgtccgggtg ctgctt	26
35	<210> 17 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
40	<400> 17 cgtgtgtgct ttgtacgcac ctccga	26
45	<210> 18 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 18 gtgtgactct acgcttcgga ggtgc	25
60	<210> 19 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
65	<400> 19 caaaccgttg tgtgatttgt taatta	26

ES 2 646 590 T3

5 <210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 20
gcttttgtc cagatgtctt tgc 23

15 <210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

20 <400> 21
gggaaggatga aggtcggagt 20

25 <210> 22
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 22
tggaagatgg tgatgggatt tc 22

35 <210> 23
<211> 151
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E6 L50G

<400> 23

ES 2 646 590 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150

<210> 24
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E6 PDZ

<400> 24

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

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

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

ES 2 646 590 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Arg Ala Ala Ala Ala
145 150

<210> 25

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E7 H2P

<400> 25

Met Pro 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

10

ES 2 646 590 T3

<210> 26
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E7 C24G

10

<400> 26

```

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

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

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

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50          55          60

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

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

Lys Pro
    
```

<210> 27
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E7 E46A

20

<400> 27

```

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 Ala Pro Asp
          35          40          45
    
```

ES 2 646 590 T3

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

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

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

Lys Pro

<210> 28
<211> 98
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E7 L67R

<400> 28

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

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

Lys Pro

<210> 29
<211> 151
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E6 L50G/PDZ

<400> 29

ES 2 646 590 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Arg Ala Ala Ala Ala
 145 150

<210> 30
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E7 H2P/C24G/E46A/L67R

<400> 30

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

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

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

ES 2 646 590 T3

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60

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

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

Lys Pro

<210> 31
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E6 L50G/PDZ E7 H2P/C24G/E46A/L67R

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 646 590 T3

Thr Arg Arg Ala Ala Ala Ala Met Pro Gly Asp Thr Pro Thr Leu His
145 150 155 160

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

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

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

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

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

Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
245

5 <210> 32
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 32
ttgcagatca tcaagaacac gtaga 25

15 <210> 33
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 33
ctgtccagc tggaccatct att 23

25 <210> 34
<211> 755
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Papilomavirus humano de tipo 16 mutante E6 L50G/PDZ E7 H2P/C24G/E46A/L67R

<400> 34

ES 2 646 590 T3

atgtttcagg acccacagga gogacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa	60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt	120
gaggtatatg actttgcttt togggatgga tgcatagtat atagagatgg gaatccatat	180
gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt	240
tatagtttgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttggtg tgatttgta	300
attaggtgta ttaactgtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac	360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cggtaggaccg gtogatgtat gtcttgttgc	420
agatcatcaa gaactcgtag agcagccgag gcgtaatcat gcctggagat acacctacat	480
tgcataaata tatgttagat ttgcaaccag agacaactga tctctacggt tatgagcaat	540
taaatgacag ctgagaggag gaggatgaaa tagatggtcc agctggacaa gcagcaccgg	600
acagagccca ttacaatatt gtaacctttt gttgcaagtg tgactctacg ctccggaggt	660
gcgtacaaag cacacacgta gacattcgta ctttggaaga cctgttaatg ggcacactag	720
gaattgtgtg ccccatctgt tctcagaac cataa	755

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que comprende:

una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido antigénico, en el que el primer polipéptido antigénico:

- a. comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29;
- b. es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria contra el primer polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente; y
- c. no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente;

y

una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido antigénico, en el que el segundo polipéptido antigénico:

- a. comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30;
- b. es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria contra el segundo polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente; y
- c. no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente;

en el que el primer polipéptido antigénico tiene las siguientes mutaciones con respecto a la SEQ ID NO:2:

- a. una mutación puntual o deleción en L50;
- b. una mutación puntual o deleción en E148;
- c. una mutación puntual o deleción en T149;
- d. una mutación puntual o deleción en Q150; y
- e. una mutación puntual o deleción en L151;

y en el que el segundo polipéptido antigénico tiene las siguientes mutaciones con respecto a la SEQ ID NO:4:

- a. una mutación puntual o deleción en H2;
- b. una mutación puntual o deleción en C24;
- c. una mutación puntual o deleción en E46; y
- d. una mutación puntual o deleción en L67.

2. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el primer polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29 y el segundo polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30.

3. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el primer polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29 y el segundo polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30.

4. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que la primera secuencia de nucleótidos codifica la SEQ ID NO:29 y la segunda secuencia de nucleótidos codifica la SEQ ID NO:30.

5. Una composición que comprende:

- a. un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- b. un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido antigénico, en el que dicho primer polipéptido antigénico:
 - i. comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29;
 - ii. es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria contra el polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente; y
 - iii. no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente;

y

c. un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido antigénico, en el que dicho segundo polipéptido antigénico:

- iv. comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30;
- v. es capaz de iniciar una respuesta inmunitaria contra el polipéptido vírico oncogénico en un hospedador inmunocompetente; y
- 5 vi. no es oncogénico en el hospedador inmunocompetente;

en la que el primer polipéptido antigénico tiene las siguientes mutaciones con respecto a la SEQ ID NO:2:

- 10 a. una mutación puntual o deleción en L50;
- b. una mutación puntual o deleción en E148;
- c. una mutación puntual o deleción en T149;
- d. una mutación puntual o deleción en Q150; y
- e. una mutación puntual o deleción en L151,

15 en la que el segundo polipéptido antigénico tiene las siguientes mutaciones con respecto a la SEQ ID NO:4:

- 20 a. una mutación puntual o deleción en H2;
- b. una mutación puntual o deleción en C24;
- c. una mutación puntual o deleción en E46; y
- d. una mutación puntual o deleción en L67.

6. La composición de la reivindicación 5, en la que el primer polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29 y el segundo polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30.

7. La composición de la reivindicación 5, en la que el primer polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29 y el segundo polipéptido antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30.

8. La composición de la reivindicación 5, en la que la primera secuencia de nucleótidos codifica la SEQ ID NO:29 y la segunda secuencia de nucleótidos codifica la SEQ ID NO:30.

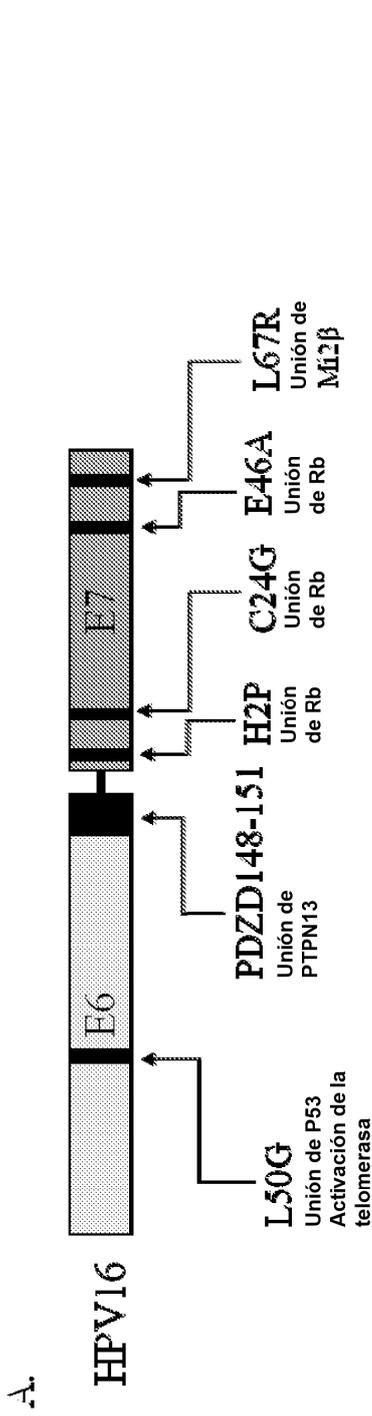
35 9. La composición de la reivindicación 5 para su uso en un método para destruir una célula que expresa el primer polipéptido vírico oncogénico en un sujeto, en la que la composición se administra al sujeto en una cantidad suficiente para iniciar una respuesta inmunitaria contra dicho primer péptido vírico oncogénico, en la que dicho primer péptido vírico oncogénico es E6 y el segundo péptido vírico oncogénico es E7 del virus del papiloma humano; dicha respuesta inmunitaria es efectiva para causar un efecto citotóxico en dicha célula.

40 10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que dicha célula es parte de una neoplasia.

11. La composición para el uso de la reivindicación 10, en la que dicha neoplasia es maligna.

45 12. La composición de la reivindicación 5, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es una envoltura de adenovirus.

50 13. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las secuencias SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30.



B. Alineación de la proteína E6

WT (SEQ ID NO:2): MFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQCLLRREYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEY
 MUT (SEQ ID NO:29): MFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQCLLRREYDFAFRDGCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEY

WT (SEQ ID NO:2): RHYCYSLYGTTLEGGYKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNRGRVWTGRCMSSCCRSRTRREIQ
 MUT (SEQ ID NO:29): RHYCYSLYGTTLEGGYKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNRGRVWTGRCMSSCCRSRTRRAAAA

Alineación de la proteína E7

WT (SEQ ID NO:4): MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPPDR
 MUT (SEQ ID NO:30): MEGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYGYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAAEPPDR

WT (SEQ ID NO:4): AHYNIVTFCKCKDS~~TLRL~~CVG~~STHVD~~IR~~TLED~~LLM~~GT~~LGV~~CP~~IC~~SQ~~KP
 MUT (SEQ ID NO:30): AHYNIVTFCKCKDS~~TLRL~~CVG~~STHVD~~IR~~TLED~~LLM~~GT~~LGV~~CP~~IC~~SQ~~KP

FIG. 1

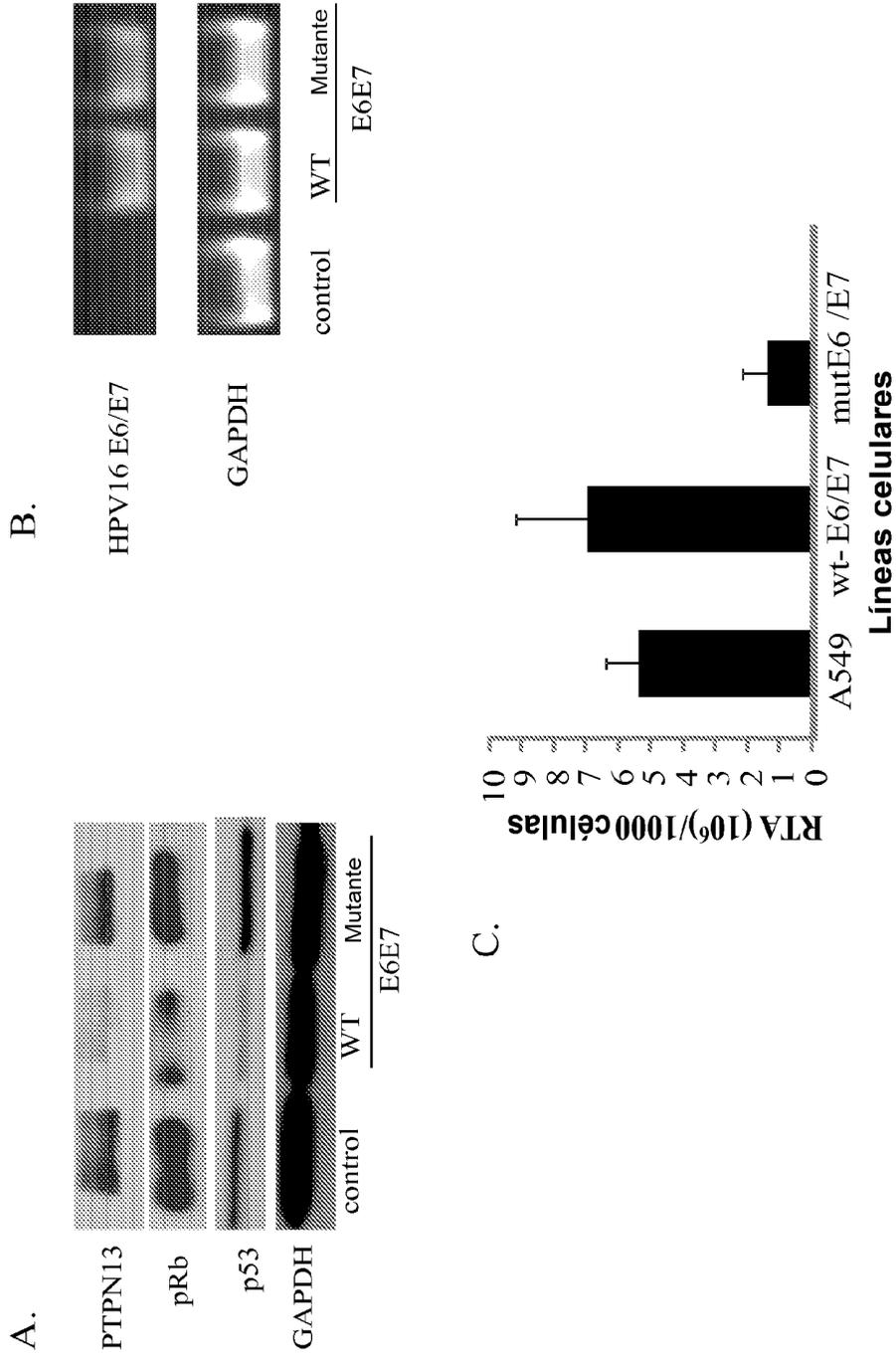


FIG. 2

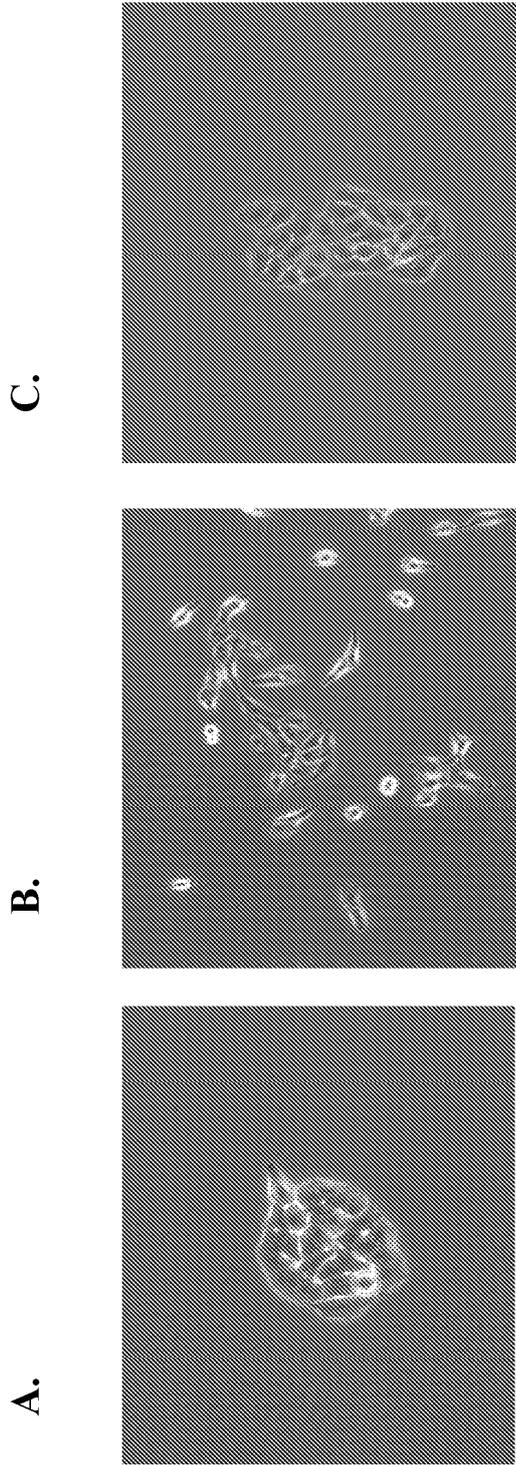


FIG. 3

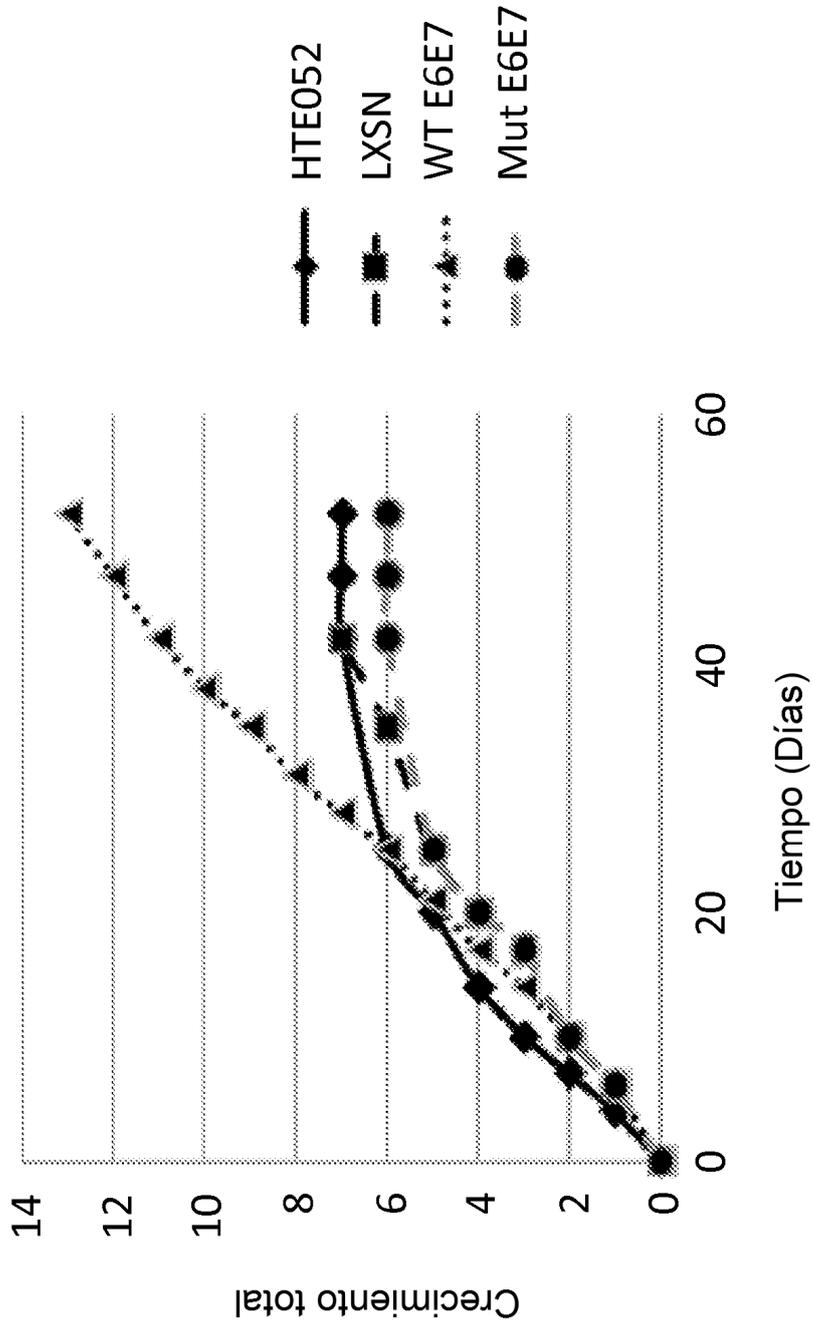


FIG. 4A

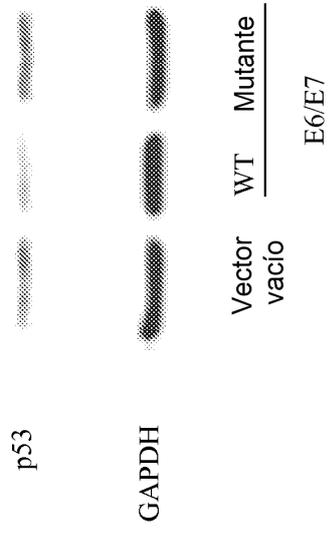


FIG. 4B

Crecimiento de HTE post-infección con Ad

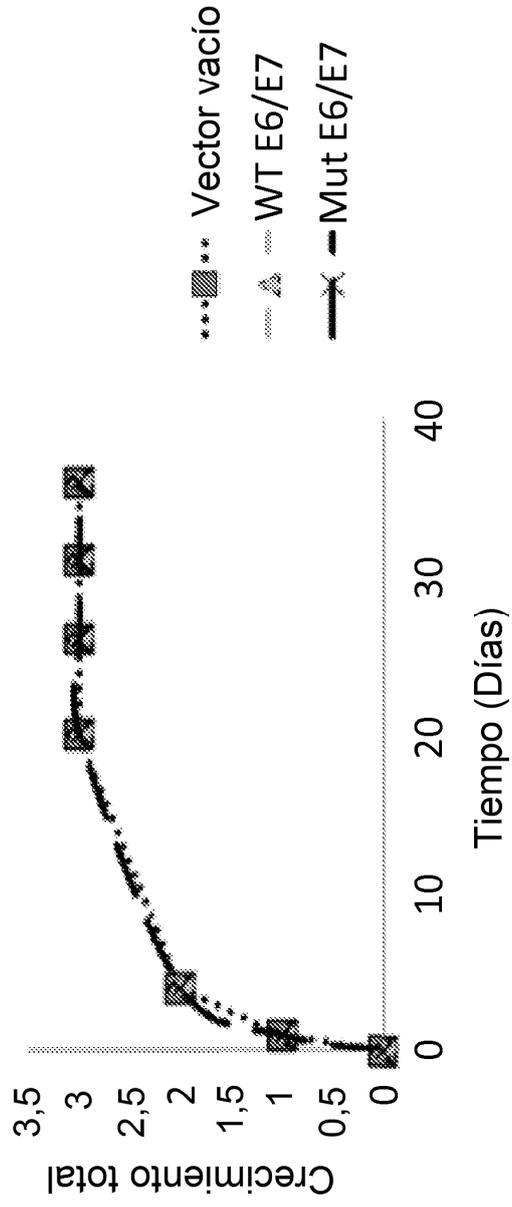


FIG. 5

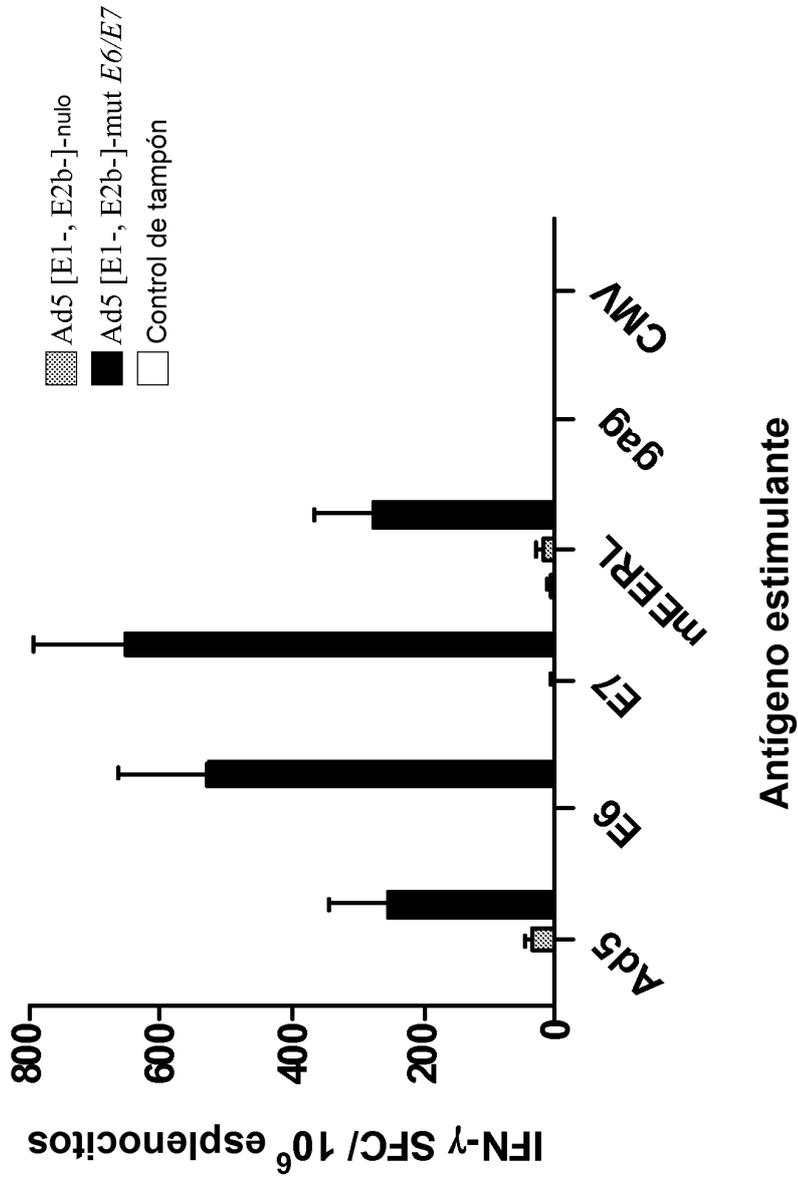


FIG. 6

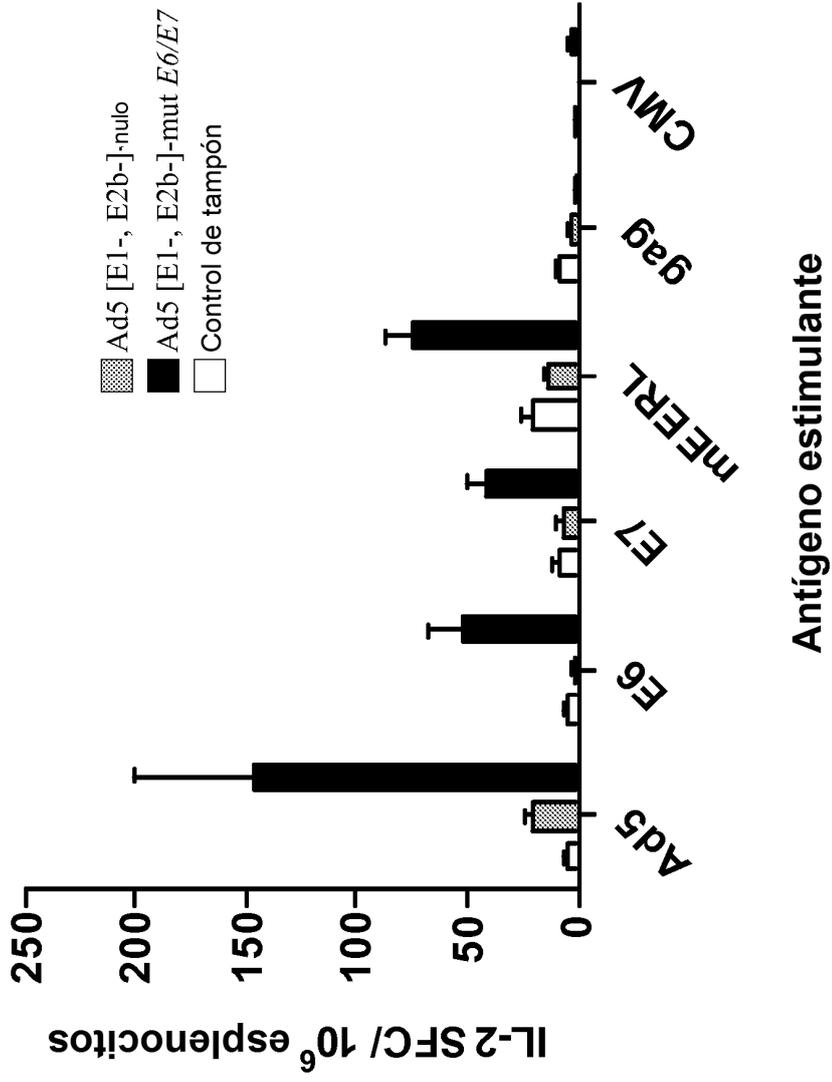


FIG. 7

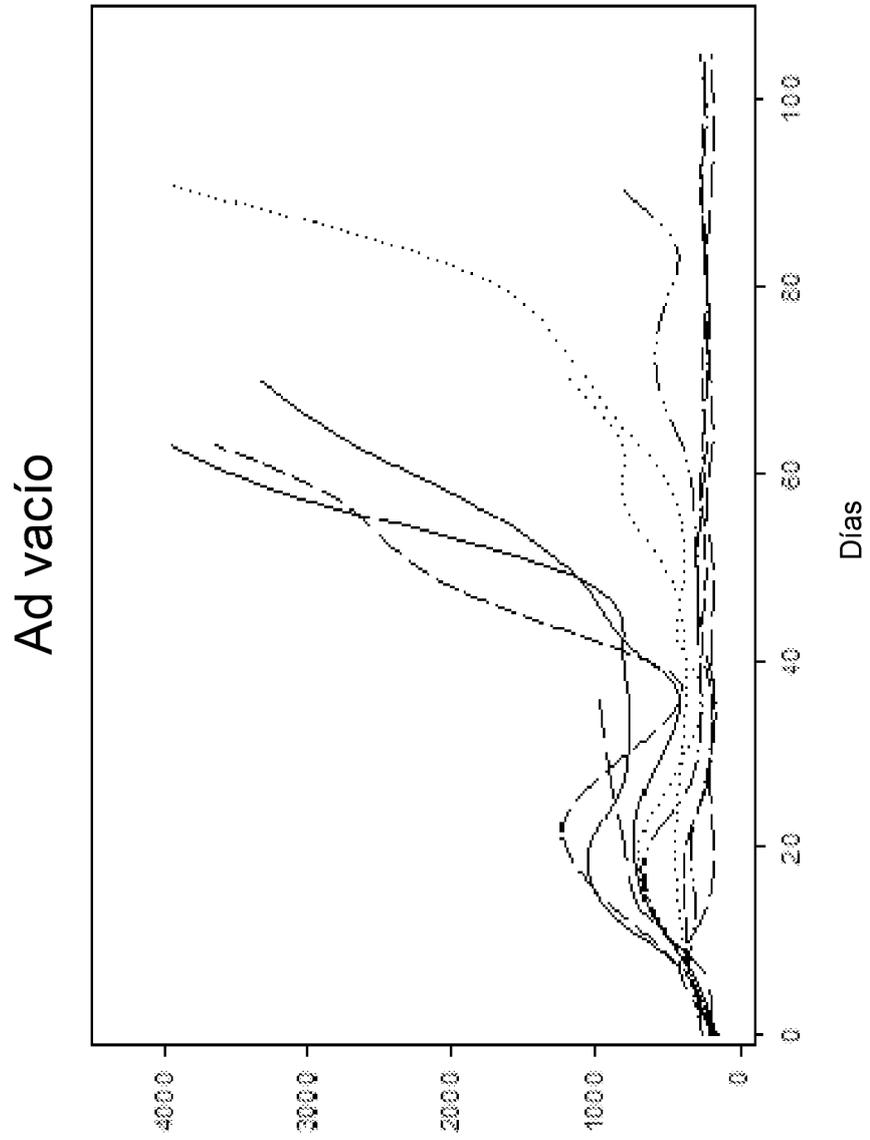


FIG. 8

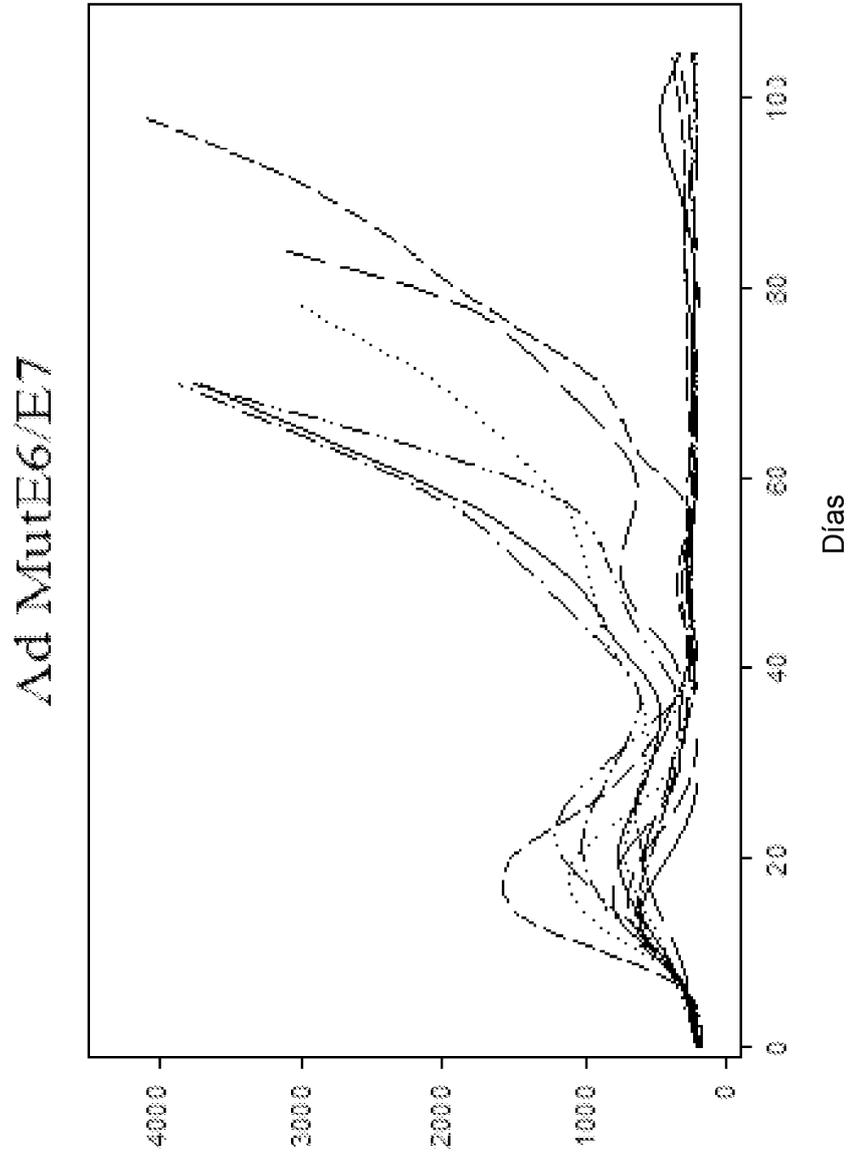


FIG. 8 continuación

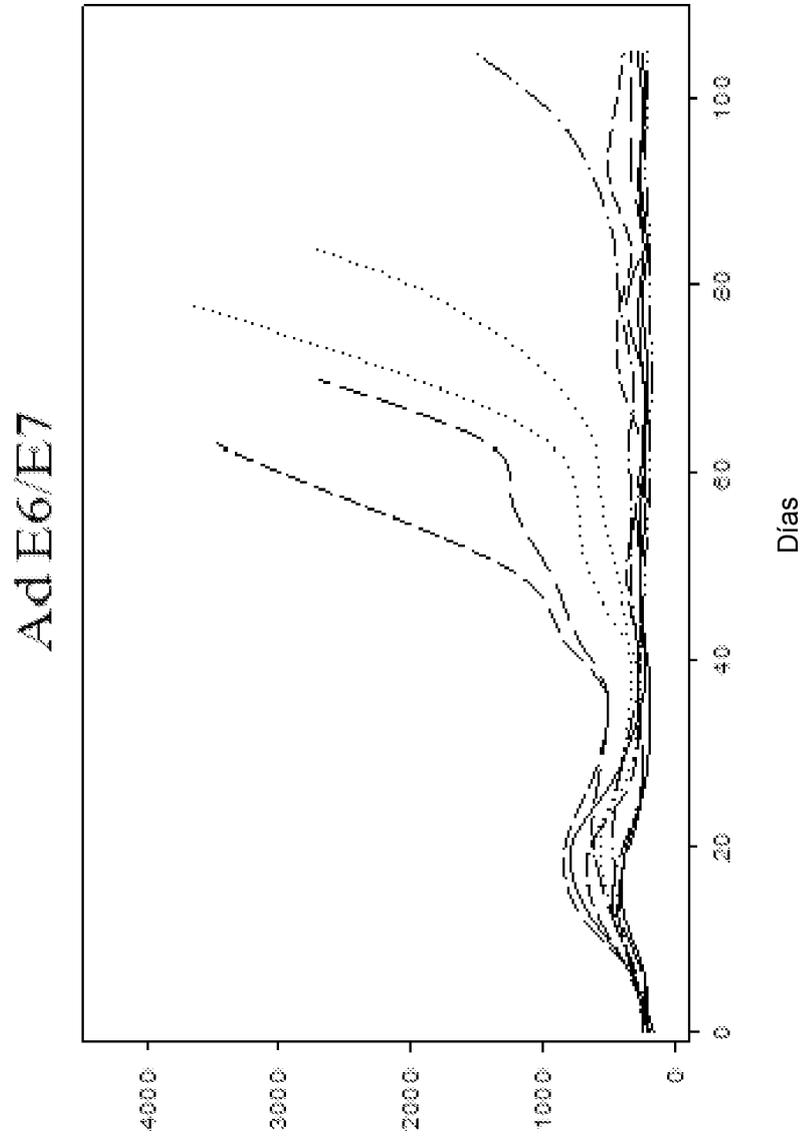


FIG. 8 continuación

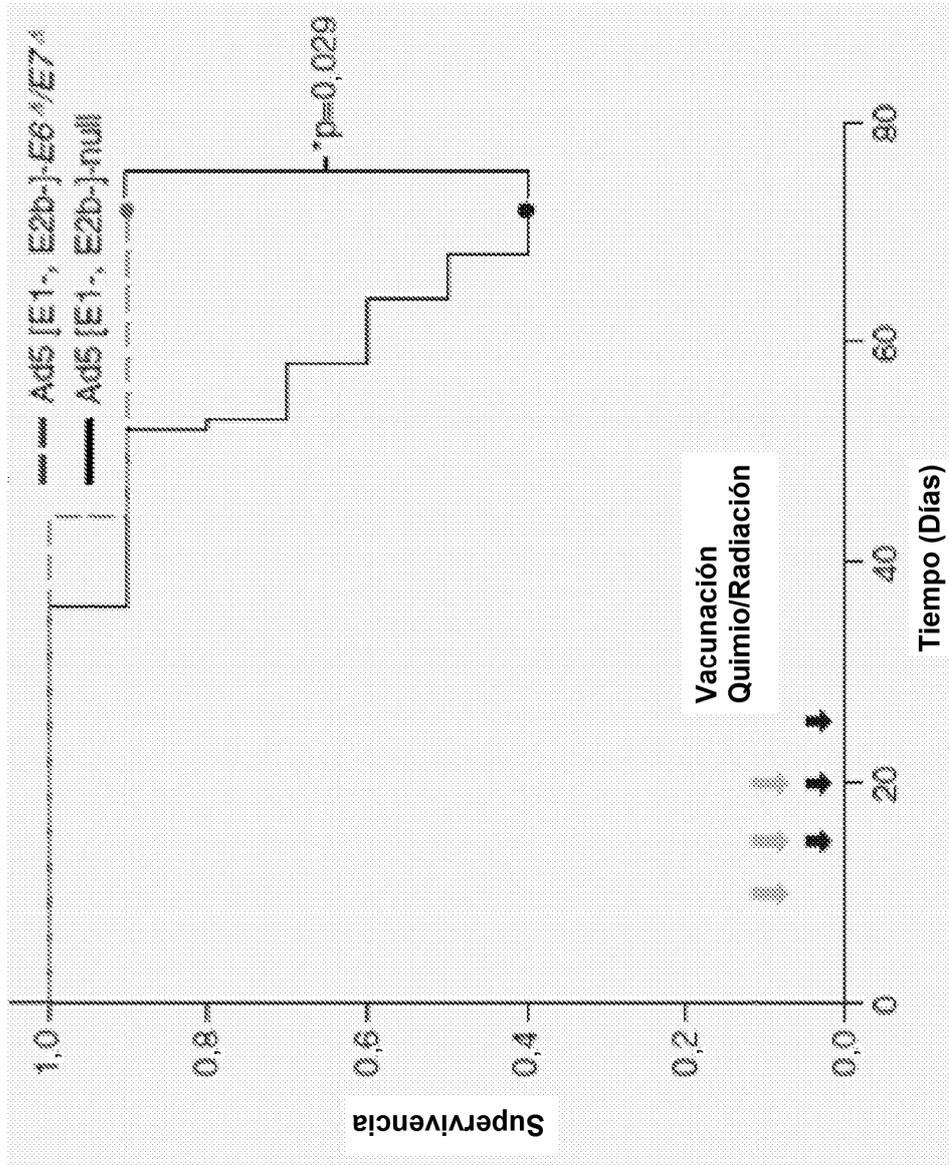


FIG. 9