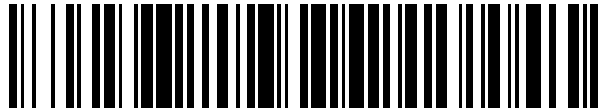


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 903**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2015 PCT/EP2015/075516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16071306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2015 E 15791556 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3215187**

54 Título: **Vacunas terapéuticas contra el VPH16**

30 Prioridad:

04.11.2014 EP 14191660

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

29.01.2019

73 Titular/es:

**JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)**

**Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**BUNNIK, EVELIEN, M;
CUSTERS, JERÔME, H,H,V,;
SCHEPER, GERRIT, CH,;
OOSTERHUIS, KOEN;
UIL, TACO, GILLES y
KHAN, SELINA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 697 903 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

Vacunas terapéuticas contra el VPH16

La invención se refiere al campo de la medicina y, más en particular, a construcciones de ácidos nucleicos y polipéptidos que se pueden utilizar en vacunas terapéuticas contra el virus del papiloma humano tipo 16.

5 **Antecedentes de la invención**

La familia de los virus del papiloma humano (VPHs) consiste en más de 100 tipos (a los que se alude también como subtipos) que son capaces de infectar queratinocitos de la piel o membranas mucosales. Más de 40 tipos de VPH son transmitidos típicamente a través del contacto sexual y las infecciones por el VPH de la región anogenital son muy comunes tanto en hombres como en mujeres. Algunos tipos de VPH transmitidos sexualmente pueden provocar verrugas genitales. Infecciones persistentes con tipos de VPH de "alto riesgo" (p. ej. Tipos 16, 18, 31, 45) - diferentes de los que provocan las verrugas en la piel - pueden progresar a lesiones pre-cancerosas y cáncer invasivo, p. ej., de cuello uterino, vulva, vagina, pene, orofaringe y ano. La mayoría de las infecciones por el VPH desaparecen espontáneamente en el espacio de uno a dos años después de la infección. En individuos sanos células T CD4+ de tipo Th1 y Th2 circulantes para las proteínas tempranas virales E2, E6 y E7 de VPH16, así como células T CD8+ específicas para E6 migran a la piel tras el enfrentamiento antigénico, lo que indica que la defensa con éxito contra la infección por el VPH está comúnmente asociada con una respuesta de células T efectoras sistémica contra estos antígenos tempranos virales. En una minoría (~1%) de individuos infectados persiste la infección, resultando en última instancia en lesiones neoplásicas genitales. Entre los VPHs de alto riesgo, VPH16 y VPH18 son la causa principal del cáncer cervical, provocando conjuntamente aproximadamente el 70% de los casos, y estos dos tipos también juegan un papel principal en otros cánceres inducidos por el VPH tales como el cáncer de ano y orofaríngeo. En todo el mundo, el VPH es uno de los agentes infecciosos más importantes que provocan el cáncer.

La vacunación contra el VPH se considera una estrategia factible para reducir la incidencia o los efectos de la infección por el VPH (van der Burg y Melief, 2011, *Curr Opin Immunol* 23: 252–257).

25 Vacunas profilácticas contra el VPH basadas en partículas de tipo virus (VLPs) formadas por la proteína L1 (envuelta) de los tipos 16 y 18 del VPH son muy eficientes en la prevención de una infección persistente y la enfermedad asociada por VPH16 y VPH18. Se piensa que estas vacunas proporcionan inmunidad estéril a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas L1. La adición de VLPs basadas en L1 de tipos de VPH de alto riesgo adicionales puede aumentar adicionalmente la amplitud de protección conferida por este tipo de vacunas.

30 Sin embargo, aunque estas vacunas pueden *prevenir* una infección inicial (es decir, resultan en la profilaxis), no existe evidencia de un efecto beneficioso sobre lesiones genitales establecidas provocadas por VPH16 y VPH18, de modo que no se consideran vacunas *terapéuticas* contra el VPH (Hildesheim *et al.*, 2007, *JAMA* 298: 743-53).

A pesar de la introducción de estas vacunas profilácticas, grandes números de personas han obtenido ya o siguen estando en riesgo de obtener infecciones por el VPH de alto riesgo persistentes, y están en riesgo de padecer cáncer. Las vacunas terapéuticas para la erradicación de infecciones por el VPH establecidas y enfermedades asociadas son una necesidad médica urgente no cumplida.

35 Se han descrito algunos intentos de abordar esta necesidad. Por ejemplo, se han llevado a cabo ensayos clínicos con una diversidad de diferentes estrategias de vacunación tales como una proteína de fusión que consiste en una proteína de choque térmico (Hsp de *Mycobacterium bovis* y PV-16 E7 o que consiste en una proteína de fusión de E6, E7 y L2 de VPH-16 y VPH-18, VLPs de L1-E7 quiméricas, virus de vacuna recombinantes que expresan E6 y E7 de VPH-16 y VPH-18 o virus del papiloma bovino E2, vacunas de ADN que expresan epítomos CTL de E6 y E7 de VPH-16 y VPH-18, una *Listeria monocytogenes* (Lm) atenuada viva que secreta el antígeno E7 de VPH-16, y péptidos largos sintéticos (SLPs) que comprenden péptidos E6 y E7 de VPH-16. Aunque algunos de estos enfoques muestran alguna eficacia clínica, pero limitada, la mayoría han fracasado, demostrando que se necesita una mejora de las actuales estrategias.

45 La integración de las proteínas E6 y E7 de VPH tempranas es una etapa necesaria en el proceso de infección a un cáncer y se requiere una expresión continua de E6 y E7 para el mantenimiento del fenotipo neoplásico de células cancerosas cervicales. Por lo tanto, E6 y E7 se consideran buenas dianas para la vacunación terapéutica. Tal como se ha mencionado, algunos estudios han demostrado que la vacunación terapéutica de mujeres infectadas con el VPH de alto riesgo puede inducir la regresión de lesiones existentes. Kenter *et al* demostraron una regresión duradera y completa en el 47% de los pacientes con Neoplasia Intraepitelial Vulvar (VIN) utilizando SLPs de las proteínas E6 y E7 de VPH16 y un adyuvante como una vacuna terapéutica (Kenter *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 361: 1838-47). De manera similar, un estudio en el que una vacuna basada en proteínas (TA-CIN que consiste en una proteína de fusión de E6, E7 y L2 de VPH16) se combinó con una modulación inmunológica local en 2/3 pacientes con VIN, mostró una regresión completa en el 63% de los pacientes (Daayana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129-36). Posibles inconvenientes de los péptidos largos sintéticos como una vacuna incluyen la capacidad de fabricación a gran escala y los costes asociados con la misma, la necesidad de un adyuvante potencialmente reactogénico y los efectos adversos asociados con la inmunización (especialmente dolor e hinchazón). Debido al alto nivel de incomodidad, no es probable que los SLPs se utilicen en una enfermedad de fase temprana cuando la tasa de desaparición espontánea es todavía alta. De manera similar, debido a la necesidad de un tratamiento local con imiquimod en el caso del

tratamiento con TA-CIN, la tolerabilidad es un aspecto significativo, dado que la mayoría de las mujeres experimenta efectos secundarios locales y sistémicos que se prolongan durante la duración del tratamiento con imiquimod, que puede afectar a las actividades diarias.

5 Una posible alteración es utilizar una vacunación basada en ácidos nucleicos tales como vacunas de ADN o vacunas víricas que codifican la proteína E6 y/o E7 del VPH para la vacunación.

Sin embargo, las proteínas E6 y E7 del VPH tienen un potencial oncogénico y, por lo tanto, la vacunación con vacunas que comprenden ácidos nucleicos que codifican estas proteínas plantea un riesgo de inducir la transformación celular debido a la posibilidad de una expresión prolongada de los antígenos.

10 Por lo tanto, en caso de una vacunación genética, se pueden utilizar versiones no oncogénicas/destoxificadas de E6 y/o E7 con el fin de excluir cualquier riesgo de transformación celular debida a la vacunación. La pérdida de potencial oncogénico de E6 y/o E7 de tipo salvaje se consigue habitualmente mediante delección y/o sustitución de residuos que se sabe son importantes para la función de estas proteínas (p. ej., Smahel *et al.*, 2001, *Virology* 281:231-38; Yan *et al.*, 2009, *Vaccine* 27: 431-40; Wieking *et al.*, 2012, *Cancer Gene Ther* 19: 667-74; WO 2009/106362). Sin embargo, una desventaja de estos enfoques es que tienen el riesgo de separar importantes epítomos de células T de y/o de introducir nuevos epítomos de células T indeseados en las proteínas y, por lo tanto, pueden no conducir a la respuesta inmunológica deseada.

20 En una estrategia alternativa para eliminar el potencial oncogénico de E6 y E7 del VPH16 se han construido versiones barajadas (es decir, polipéptidos, en donde los fragmentos de la proteína de tipo salvaje están re-ordenados) de las proteínas E6 y E7 (p. ej., Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406; Oosterhuis *et al.*, 2012, *Hum Gen Ther* 23: 1301-12). Sin embargo, estos enfoques seguirían requiriendo la fabricación, formulación y administración de múltiples moléculas para asegurar la inclusión de todos los posibles epítomos de las dos proteínas E6 y E7, resultando logísticas sub-óptimas y costes relativamente altos y, además de ello, las estrategias descritas introducen epítomos no naturales potencialmente fuertes que no están presentes en E6 y E7, y dado que las respuestas inmunológicas podrían ser desviadas de los epítomos E6/E7 relevantes hacia esos epítomos no naturales, las construcciones descritas pueden no tener las características inmunológicas óptimas.

25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de vacunas terapéuticas contra el VPH que tengan preferiblemente menos de los inconvenientes de los enfoques descritos antes.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que comprenden esencialmente todos los epítomos de células T posibles de oncoproteínas E6 y E7 del VPH16, pero, no obstante, que tienen una actividad transformante fuertemente reducida (en comparación con E6 y E7 de tipo salvaje (wt)) hasta no detectable, que comprenden fragmentos de las proteínas E6 y E7 que han sido re-ordenadas, conteniendo al mismo tiempo un número minimizado de neo-epítomos indeseados. Esto está en contraposición con moléculas previamente presentadas por otros.

35 La invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia como la recogida en la SEQ ID NO: 1.

El polipéptido codificado puede comprender, además, una secuencia líder.

40 En determinadas realizaciones, el polipéptido codificado comprende, además, al menos un epítomo de una proteína E2 del virus del papiloma humano (VPH), por ejemplo, una proteína E2 de VPH16. La proteína E2 puede estar mutada para disminuir la unión al ADN, p. ej., mediante una delección o mutación(es) en su dominio de unión al ADN. En determinadas realizaciones, el polipéptido codificado comprende una secuencia como la recogida en la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

En determinadas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos está optimizada en codones, p. ej., para la expresión en células humanas.

45 En determinadas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos comprende una secuencia como la recogida en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 6.

La invención también proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, en donde la secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor.

50 En determinadas realizaciones, el vector es un vector de ADN tal como un plásmido. En otras realizaciones, el vector es un vector vírico tal como un vector de MVA o un vector adenovírico recombinante. En determinadas realizaciones preferidas, el vector es un adenovirus recombinante.

En determinadas realizaciones, el promotor en el vector está operativamente acoplado a una secuencia de operador represor a la que una proteína represora se puede unir con el fin de reprimir la expresión del promotor en presencia de dicha proteína represora. En determinadas realizaciones, la secuencia de operador represor es una secuencia

TetO o una secuencia CuO.

La invención proporciona también una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La invención proporciona también una vacuna de acuerdo con la invención para uso en inducir una respuesta inmunológica contra el VPH, en particular VPH16, en un sujeto.

En determinadas realizaciones, la vacuna se administra al sujeto más de una vez.

10 La invención proporciona también una vacuna de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de cualquiera de: infección persistente por VPH (en particular, infección persistente por VPH16), neoplasia intraepitelial vulvar (VIN), neoplasia intraepitelial cervical (CIN), neoplasia intraepitelial vaginal (VaIN), neoplasia intraepitelial anal (AIN), cáncer cervical (tal como carcinoma cervical de células escamosas (SCC), cáncer orofaríngeo, cáncer del pene, cáncer vaginal o cáncer anal en un sujeto.

La invención también proporciona un polipéptido que comprende una secuencia como la recogida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

Breve descripción de las Figuras

15 **Fig. 1. Expresión de proteínas de fusión de E6 y E7 de VPH16.** Células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con vectores de ADN que expresan los transgenes indicados por encima de la figura. 24 h después de la transfección, las células se recolectaron y los extractos celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia western con un anticuerpo contra E7 de VPH16 (panel superior). Un control de carga que muestra NF- κ B (panel inferior) confirma una carga similar de lisados celulares en todas las pistas. Un marcador del peso molecular se indica a la izquierda. Tamaños esperados de las proteínas de fusión: E6E7SH aprox. 38kDa; E2E6E7SH y E6E7E2SH aprox. 75kDa, LSE2E6E7SH aprox. 78kDa.

20 **Fig. 2. Formación de colonias en agar blando.** A) Representación esquemática de la disposición del ensayo de agar blando. B) Imágenes al microscopio representativas a un aumento de 40x de las células en agar seis semanas post-siembra. La flecha blanca destaca colonias observadas en las células transfectadas con E7wt. C) Cuantificación de las colonias seis semanas post-siembra en agar utilizando el software Gelcount™ y asociado. *: $p < 0.05$ (modelo de regresión de Poisson); **: no-inferior (modelo lineal generalizado con margen de no inferioridad de 5%).

25 **Fig. 3. E6E7SH ha perdido actividades de E6 y E7.** A) Transferencia western representativa que demuestra la ausencia de degradación de p53 por parte de E6E7SH. Células NCI-H1299 nulas para p53 humanas se co-transfectaron con un plásmido que expresa p53 en combinación con un plásmido que expresa E6 de VPH16 de tipo salvaje, E6E7SH o el vector vacío. Non-TF indica células no transfectadas. 24 horas después de la transfección, se prepararon lisados celulares y 30 μ g de proteína total se cargaron en gel. Panel superior - tinción de p53, panel medio - tinción con E6, panel inferior - tinción con NF- κ B (control de carga). (B) Cuantificación de niveles de p53 en cuatro ensayos independientes. La señal de p53 se normalizó a la señal de NF- κ B. C) Transferencia Western que demuestra la falta de degradación de pRb por parte de E6E7SH. Células Saos-2 nulas para pRb se transfectaron con un plásmido que expresa pRb en combinación con un plásmido que expresa E7 de VPH16 de tipo salvaje, E6E7SH o el vector vacío. Non-TF indica células no transfectadas. 24 horas después de la transfección, se prepararon lisados celulares y 10 μ g de proteína total se cargaron en gel. Panel superior - tinción de pRb, panel medio - tinción con E7, panel inferior - tinción con NF- κ B (control de carga). D) Cuantificación de niveles de pRb en cuatro ensayos independientes. La señal de pRb se normalizó a la señal de NF- κ B. *: $p < 0.05$ (modelos ANOVA); **: no-inferior (el ensayo se basó en 95% de CI derivados de modelos ANOVA. El margen de no inferioridad se estableció en 75%).

35 **Fig. 4. E6E7SH no inmortaliza queratinocitos epidérmicos humanos primarios.** Queratinocitos epidérmicos humanos primarios se transfectaron con lentivirus que codifican E6 y E7 de tipo salvaje que codifican el marco de lectura abierto de VPH16 (E6E7wt), la secuencia de E6E7SH o eGFP. Como control se utilizaron células de donantes no transducidas. Sólo la expresión de E6E7wt induce la inmortalización de queratinocitos primarios, tal como se indica por la esperanza de vida prolongada y la activación de hTERT en torno al día 200 (no mostrado). El símbolo de la cruz indica que las células murieron en senescencia y no se pudieron cultivar ulteriormente. Para detalles, véase el ejemplo 2. Resultados similares se obtuvieron en dos donantes adicionales (no mostrados).

40 **Fig. 5. Respuesta inmunológica inducida por E6E7SH después de inmunización de ADN – análisis ELISPOT de IFN γ .** A. Esquema de inmunización. Ratones CB6F1 fueron inmunizados con plásmidos de ADN que expresan E6E7SH o un plásmido que no expresa un transgen (control). Dos semanas después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados y los esplenocitos aislados fueron estimulados durante una noche con agrupaciones de péptidos 15meros correspondientes a E7. B. Respuestas inmunológicas específicas para E7 en ratones individuales tal como se miden por ensayos IFN γ ELISPOT se dan como unidades formadores de puntos (SFU) por cada 10^6 esplenocitos.

45 **Fig. 6. Inmunogenicidad de E6E7SH – análisis de IFN γ ELISPOT.** (A). Esquema de inmunización. Ratones fueron inmunizados con adenovectores con inserciones tal como se indica. Las respuestas específicas para E7 a las dos semanas (B) y a las ocho semanas (C) fueron analizadas mediante IFN γ ELISPOT (representadas como unidades formadores de puntos (SFU) por cada 10^6 esplenocitos). Los círculos en negro representan ratones inmunizados con una dosificación de 1×10^{10} vp, y los círculos en blanco representan ratones inmunizados con 5×10^9 vp. La barra negra representa la media geométrica de las respuestas. La línea discontinua indica el límite de detección bajo en el ensayo ELISPOT. El análisis estadístico Post-hoc de ANOVA de Bonferroni se realizó en datos logarítmicamente

transformados. *: $p < 0.05$. Para detalles, véase el ejemplo 3.

Fig. 7. Inmunogenicidad de E2E6E7SH – tinción del tetrámero de E7. (A). Esquema de inmunización. Ratones CB6F1 fueron inmunizados con 1×10^{10} vp de adenovectores que expresan los transgenes tal como se indica. Dos semanas después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados y los esplenocitos aislados fueron analizados en cuanto a la presencia de células CD8+ capaces de interactuar con tetrámeros E7₄₉₋₅₇-H2-Db (B). El porcentaje de células T CD8+ tetrámero de E7 positivas se indica en el eje y. El análisis estadístico Post-hoc de ANOVA de Bonferroni se realizó en datos logarítmicamente transformados, las diferencias entre las diferentes variantes de E6E7SH no eran estadísticamente significativas.

Fig. 8. Inmunogenicidad de E2E6E7SH – análisis de IFN γ ELISPOT. (A). Esquema de inmunización. Ratones CB6F1 fueron inmunizados con adenovectores que expresan los transgenes indicados más adelante en los paneles B y C. Dos semanas después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados y los esplenocitos aislados fueron estimulados durante una noche con agrupaciones de péptidos 15meros correspondientes a E2 (B), E6 (no mostrado) o E7 (C). Las respuestas se dan como SFU por cada 10^6 esplenocitos. El análisis estadístico Post-hoc de ANOVA de Bonferroni se realizó en datos logarítmicamente transformados. La respuesta de E2 inducida por Adenovectores que codifican E2 solo es mayor que la respuesta inducida por los polipéptidos de la invención que incluyen fragmentos de E6 y E7. La diferencia es significativa para E2 frente a E2E6E7SH y E2 frente a E6E7E2SH (*: $p < 0.05$). El análisis estadístico Post-hoc de ANOVA de Bonferroni se realizó en datos logarítmicamente transformados.

Fig. 9. Respuestas sostenidas en ratones inmunizados. (A) Esquema de inmunización. Ratones CB6F1 fueron inmunizados con 1×10^{10} vp de vectores Ad35 que expresan variantes LSE2E6E7SH, E2E6E7SH, E6E7SH, o con un adenovector que no expresa un transgen (vacío). Se recogieron muestras de sangre cada dos semanas para determinar el porcentaje de células T CD8+ específicas para E7 mediante tinción del tetrámero. (B) Respuestas inmunológicas dos semanas después de la inmunización. El vector que incluía una secuencia líder inducía una mayor respuesta que los vectores sin la secuencia líder; LSE2E6E7SH frente a E2E6E7SH (*: $p < 0.05$). (C) Cinéticas de las respuestas. El análisis estadístico Post-hoc de ANOVA de Bonferroni se realizó en datos logarítmicamente transformados del conjunto de datos de la semana 2. La respuesta de E7 inducida por moléculas incluyendo E2 tendía a ser más alta en comparación con la molécula sin E2, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos.

Fig. 10. Uso de diferentes vectores Adenovirales para potenciar las respuestas inmunológicas. (A). Esquema de inmunización. Ratones CB6F1 fueron inmunizados con el vector Ad26 que expresa E2E6E7SH de VPH16 (VPH16-Tx), o con un vector Ad26 que no expresa un transgen (vacío). Dos semanas más tarde se repitieron las inmunizaciones con vectores basados en Ad35 tal como se indica debajo de la figura. Cuatro semanas después de la segunda inmunización, los ratones fueron sacrificados y las muestras de sangre se utilizaron para determinar el porcentaje de células T CD8+ específicas para E7 mediante la tinción del tetrámero (B). * indica la comparación de Ad26.VPH16-Tx/Ad35.VPH16-Tx frente a Ad26.VPH16-Tx/Ad35.Vacío, $p < 0.05$ (test-t de student en datos logarítmicamente transformados, con $\alpha = 0.01$ para múltiples comparaciones).

Fig. 11. Inmunogenicidad celular de E2E6E7SH en macacos Rhesus. (A) Esquema de inmunización. Macacos Rhesus fueron inmunizados el día 0: Ocho animales recibieron Ad26.VPH16-E2E6E7SH y dos animales control recibieron Ad26.Vacío mediante inmunización intramuscular (i.m.). Se administró una inmunización de refuerzo (Ad26.VPH16-E2E6E7SH o Ad26.Vacío) a las 8 semanas. A las 16 semanas, los animales recibieron una segunda inmunización de refuerzo con vectores Ad35 que expresan el mismo E2E6E7SH, mientras que los animales control recibieron Ad35.Vacío. La dosis de adenovectores era 1×10^{11} vp por cada inmunización. Se realizaron extracciones de sangre en varios momentos. (B) Respuestas inmunológicas celulares en PBMCs se midieron mediante IFN γ ELISPOT. Las PBMCs fueron estimuladas con agrupaciones de péptidos correspondientes a E2, E6 o E7 del VPH y se representa el número de unidades formadoras de puntos (SFU) en 1×10^6 PBMCs. El animal control vacío ($n=2$) no mostró respuestas detectables. Para detalles, véase el ejemplo 4.

Fig. 12. Efectos terapéutico de Adenovectores que expresan VPH16-E2E6E7SH. (A) Inyección de TC-1 y esquema de inmunización A ratones CB6F1 se les inyectaron por vía sub-cutánea 1×10^5 células TC-1 el día 0. Después de seis días, cuando los tumores eran palpables, los ratones fueron inmunizados con dos SLPs que cubren epítomos dominantes de E6 y E7 de VPH16 E6 and E7 (es decir, HPV16 E6, aa41-65 (KQQLLRREVYDFAFRDLICIVYRDGN; SEQ ID NO: 18) y HPV16 E7 aa 43-77 (GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCQSTHVDIR; SEQ ID NO: 19)) a razón de 150 μ g en un volumen final de 200 μ l de solución salina al 0.9% complementada con 5 nmol de ODN1826-CpG (B) o Ad26.VPH16-E2E6E7SH (C). Los ratones control recibieron CpG solo (D) o Ad26.Vacío (E). Todos los ratones recibieron una inmunización de refuerzo el día 20. Los ratones que recibieron vectores Ad26 en la inmunización principal fueron subsiguientemente inmunizados con los correspondientes vectores Ad35. Los otros ratones recibieron SLP adyuvado con CpG o CpG solo como en las inmunizaciones principales. (B-E) Medición del tumor en ratones a los que se inyectó TC-1. El volumen del tumor se calculó como (anchura² * longitud)/2. Los ratones fueron sacrificados cuando los volúmenes de los tumores superaron 1000 mm³. Hubo que sacrificar a dos ratones debido a una pérdida de peso de más de 20% (indicado con asteriscos). (F-G) Detalle de los paneles B y C durante los primeros 35 días. (H) Supervivencia tras inyección de TC-1. La supervivencia de ratones tratados con Ad.VPH16-E2E6E7SH aumentó significativamente en comparación con ratones inmunizados con SLP y CpG (prueba de rango logarítmico $p < 0.05$). Tres ratones inmunizados con Ad.VPH16-E2E6E7SH estaban exentos de tumores al término del experimento (el día 92).

Fig. 13. Vectores Adenovirales que portan transgenes que codifican VPH Ag o LSE2E6E7SH muestran rendimientos víricos incrementados en células capaces de reprimir la expresión de los transgenes. A) Ensayo del rendimiento vírico para vectores Ad35. Células PER.C6, PER.C6/CymR y PER.C6/TetR fueron infectadas mediante vectores Ad35 que portan transgenes que codifican GFP-Luc o VPHAg. Estos transgenes fueron impulsados por promotores de CMV que contienen CuO o TetO. Los rendimientos víricos se determinaron cuatro días después de

la infección mediante un método basado en qPCR específica para el hexón Ad35. B) Ensayo del rendimiento vírico para vectores Ad26. Células PER.C6 y PER.C6/TetR fueron infectadas mediante vectores Ad26 que portan transgenes que codifican GFP-Luc, VPHAg o LSE2E6E7SH, todos los cuales fueron impulsados por un promotor de CMV que contiene TetO. Los rendimientos víricos se determinaron tres días después de la infección mediante un método basado en qPCR específica para el hexón Ad26. Para detalles, véase el Ejemplo 6.

Fig. 14. El empleo de un sistema represor para reprimir la expresión de los transgenes durante la producción del vector que previene la inestabilidad de la casete de los transgenes en un vector adenoviral que porta un transgen que codifica VPHAg. Un vector Ad35 que expresa VPHAg bajo el control de CMVCuO fue rescatado mediante transfección de ADN en líneas celulares PER.C6 o PER.C6/CymR. Se eligieron placas virales resultantes - cinco por cada línea celular - y se utilizaron para rondas de infección consecutivas en las respectivas líneas celulares. A) Análisis de la integridad de la región de la casete del transgen del vector mediante PCR después de 10 pasajes virales. Los productos de la PCR obtenidos de aislados víricos que pasaron en PER.C6 y PER.C6/CymR se muestran en los paneles central y derecho, respectivamente. Los productos de la PCR que aparecen en su longitud completa para los aislados víricos 1, 2, 4 y 5 que pasaron PER.C6 y los vistos para los aislados víricos 1 a 5 que pasaron PER.C6/CymR se analizaron mediante la secuenciación de ADN de Sanger. El análisis de las trazas del cromatograma (no mostradas) revelaron que todos los aislados cultivados en PER.C6, pero no los cultivados en PER.C6/CymR contenían pequeñas deleciones de desplazamiento de marco o mutaciones de detención prematura dentro de la secuencia codificante de VPHAg. B) Análisis de la capacidad de los vectores de expresar VPHAg después de siete pasajes víricos. Células A549 fueron transducidas mediante los aislados víricos cultivados en PER.C6 y PER.C6/CymR y la expresión de VPHAg fue analizada mediante Transferencia Western utilizando un anticuerpo específico para E7 de VPH16. El tamaño predicho para VPHAg es de 83 kDa. Para detalles, véase el Ejemplo 6.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1. El polipéptido es un polipéptido de fusión, y a veces se le alude en esta memoria como el polipéptido de la invención, o el polipéptido de fusión de la invención. Este polipéptido es útil para generar una respuesta inmunológica contra las proteínas E6 y E7 de VPH16 y, por lo tanto, la molécula de ácido nucleico se puede utilizar como una vacuna terapéutica para prevenir una infección persistente por el VPH16 y enfermedades asociadas con la misma.

El polipéptido de la invención es una molécula cuidadosamente diseñada que contiene virtualmente las secuencias de aminoácidos de E6 y E7 completas de VPH16 (carece únicamente del extremo C de la proteína E6 de VPH16 nativa) en forma de fragmentos que están re-ordenados y que se solapan parcialmente de manera que (esencialmente) están presentes todos los epítomos de células T de las proteínas E6 y E7 de VPH16. Moléculas anteriores con algún potencial como las vacunas contra el VPH han sido descritas por otros (p. ej. Kenter *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 361: 1838-47; Daayana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129-36; Smahel *et al.*, 2001, *Virology* 281: 231-38; Yan *et al.*, 2009, *Vaccine* 27: 431-40; Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406; EP1183368, WO 2013/083287), pero cada una de estas moléculas tiene uno o más inconvenientes. Las moléculas de polipéptidos diseñadas de la invención son ventajosas en al menos uno y típicamente varios aspectos con respecto a los enfoques descritos anteriormente. En particular, ventajas de las moléculas y/o vectores de la presente invención incluyen: (i) tienen un perfil de seguridad deseado, dado que el ácido nucleico tiene una actividad transformante de fuertemente reducida (en comparación con proteínas E6 y E7 nativas) a no detectable; (ii) son moléculas de ácidos nucleicos sencillas que son fáciles de fabricar a escala industrial de una manera económicamente factible, y no plantea retos logísticos a diferencia de enfoques de moléculas múltiples; (iii) los polipéptidos codificados comprenden esencialmente todos los epítomos de células T de las proteínas E6 y E7 de VPH16 nativas; (iv) el diseño de los polipéptidos codificados ha minimizado la introducción de neo-epítomos fuertes potenciales indeseados (es decir, epítomos que no están presentes en las proteínas E6 y E7 nativas); (v) en determinadas realizaciones, no dependen de adyuvantes altamente reactogénicos para aumentar una respuesta inmunológica deseada. Por lo tanto, las moléculas de la invención representan una etapa principal avanzada al combinar diversas características ventajosas en un solo diseño, y son excelentes candidatos principalmente por su vacunación terapéutica contra VPH16. Estas moléculas también podrían actuar posiblemente como vacunas profilácticas contra VPH16, lo que significa que es probable que eviten una infección persistente con VPH16 de sujetos vacunados.

En determinadas realizaciones, mediante un diseño cuidadoso, el número de neo-epítomos con una longitud de nueve aminoácidos con una afinidad de unión predicha <50 nM para los 20 alelos HLA-A más comunes, los 20 alelos HLA-B más comunes y los 20 alelos HLA-C más comunes se minimizó a solamente 1. Esta es una mejora significativa frente a construcciones descritas por otros, las cuales para una proteína E6 barajada sencilla ya contenía más de 30 de estos neo-epítomos, y construcciones que muy probablemente comprenderán incluso varios más neo-epítomos en secuencias que colgaban de estas construcciones para evitar la pérdida de epítomos (Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93). Por lo tanto, las construcciones de la invención tienen un perfil inmunológico significativamente mejorado, ya que las probabilidades de una respuesta inmunológica alterada en comparación con E6 y E7 nativas han sido minimizadas en las moléculas de la invención, en comparación con enfoques descritos por otros.

Las personas expertas, utilizando técnicas rutinarias, pueden hacer sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos descritos para reflejar el uso de codones de cualquier organismo huésped particular en el que se han de expresar los polipéptidos. Por lo tanto, a menos que se especifique de otro modo, una "secuencia de aminoácidos que codifica una secuencia de nucleótidos" incluye todas las secuencias

de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

5 En una realización preferida, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con la invención está optimizado en codones para la expresión en células de mamíferos, preferiblemente células humanas. Métodos de optimización de codones son conocidos y han sido descritos previamente (p. ej., documento WO 96/09378). Una secuencia se considera optimizada en codones si al menos un codón no preferido en comparación con una secuencia de tipo salvaje es reemplazado por un codón que es más preferido. En esta memoria, un codón no preferido es un codón que se utiliza menos frecuentemente en un organismo que otro codón que codifica el mismo aminoácido, y un codón que es más preferido es un codón que se utiliza más frecuentemente en un organismo que un codón no preferido. La frecuencia del uso de codones para un organismo específico se puede encontrar en tablas de frecuencia de codones tales como en <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Preferiblemente, más de un codón no preferido, p. ej., más de 10%, 40%, 60%, 80% de codones no preferidos, preferiblemente la mayoría (p. ej., a lo sumo 90%) o todos los codones no preferidos son reemplazados por codones que son más preferidos. Preferiblemente, los codones más frecuentemente utilizados se utilizan en una secuencia optimizada en codones. El reemplazo por codones preferidos conduce generalmente a una mayor expresión.

Secuencias de ácidos nucleicos se pueden clonar utilizando técnicas de biología molecular rutinarias, o generara de nuevo mediante síntesis de ADN, que se puede realizar utilizando procedimientos rutinarios por compañías de servicios que negocian en el sector de la síntesis de ADN y/o la clonación molecular (p. ej., GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

20 Se apreciará por una persona experta que se puede efectuar cambios en una proteína, p. ej., mediante sustituciones, deleciones, adiciones de aminoácidos, etc., p. ej., utilizando procedimientos de biología molecular rutinarios. Generalmente, se pueden emplear sustituciones conservativas de aminoácidos sin pérdida de función o inmunogenicidad de un polipéptido. Esto se puede verificar de acuerdo con procedimientos rutinarios bien conocidos por la persona experta.

25 En determinadas realizaciones, el polipéptido codificado de acuerdo con la invención comprende una secuencia líder, a la que también se alude como una secuencia señal o péptido señal. Este es un péptido corto (típicamente de 5-30 aminoácidos de longitud) presente en el extremo N de la mayoría de las proteínas sintetizadas de nuevo que están destinadas a la vía secretora. La presencia de una secuencia de este tipo puede conducir a una expresión e inmunogenicidad incrementadas. Ejemplos no limitantes que se pueden utilizar son un péptido conductor de IgE (véase, p. ej., el documento US 6,733,994; p. ej., que tiene la secuencia MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO: 7)) o el péptido conductor HAVT20 (p. ej., que tiene la secuencia MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 9)). Uno de estos se pueden añadir opcionalmente al extremo N de un polipéptido de la invención. En otras realizaciones, un polipéptido de acuerdo con la invención no comprende una secuencia líder.

35 Existen diversos tipos de VPH (se han identificado más de 120 tipos y se les alude por un número) y generalmente para cada uno de los tipos que necesita ser cubierto por una vacuna, se puede necesitar incorporar antígenos específicos para el tipo en la vacuna, aunque para determinados antígenos podría existir alguna reactividad cruzada. Los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 son VPHs carcinogénicos de "alto riesgo" transmitidos sexualmente y pueden conducir al desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical (CIN), neoplasia intraepitelial vulvar (VIN), neoplasia intraepitelial vaginal (VaIN), neoplasia intraepitelial del pene (PIN) y/o neoplasia intraepitelial anal (AIN). El VPH de acuerdo con la invención (es decir, el VPH del que se derivan los fragmentos E6 y E7 en el polipéptido codificado) es VPH16. Se puede utilizar para sujetos que están infectados con VPH16. En determinadas realizaciones también se puede combinar adecuadamente con vacunas contra otros tipos de VPH. En determinadas realizaciones, esta combinación es con una vacuna contra el VPH de un tipo de alto riesgo tal como se identifica arriba, p. ej., con una vacuna contra VPH18. En otras realizaciones, la vacuna de la invención se combina con una vacuna contra uno o más de VPH-18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 o -82. Tales combinaciones podrían utilizarse, por ejemplo, si el tipo exacto de infección por el VPH no es aún cierto, o si se desea una respuesta inmunológica con un efecto profiláctico contra más de un tipo de VPH. También están previstas combinaciones de las vacunas de la invención con vacunas contra tipos del VPH que provocan verrugas genitales tales como VPH6 y/o VPH11. Secuencias de estos tipos de VPH y las proteínas codificadas con ello (p. ej., E6, E7, E2) están disponibles para la persona experta en bases de datos públicas tales como la base de datos de secuencia GenBank proporcionada por National Center for of technology Information (NCBI).

El polipéptido de acuerdo con la invención comprende la SEQ ID NO: 1, y en una realización la molécula de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención comprende la SEQ ID NO: 2.

55 Las secuencias en esta memoria se proporcionan de la dirección 5' a 3' o del extremo N al extremo C, como es habitual en la técnica.

El polipéptido de acuerdo con la invención comprende los epítomos de las proteínas E6 y E7 de VPH16. En determinadas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende además (y, por lo tanto, el ácido nucleico que codifica el polipéptido codifica, además) al menos un antígeno o epítomo(s) adicional de dicho antígeno adicional. Un antígeno adicional de este tipo es un antígeno de VPH, preferiblemente del mismo tipo de VPH que las

proteínas E6 y E7 en el polipéptido, es decir, VPH16. Un antígeno adicional de este tipo puede ser, por lo tanto, una proteína del VPH o un fragmento inmunogénico de la misma, y en determinadas realizaciones comprende una proteína E2 o un fragmento de la misma que comprende al menos un epítipo de E2 de VPH, preferiblemente de VPH16. Antígenos o epítopos adicionales de este tipo se podrían disponer internamente entre dos fragmentos de E6 y/o E7 en el polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1, pero preferiblemente están condensados en el extremo N o en el extremo C al polipéptido E6/E7 que comprende la SEQ ID NO: 1. Alternativamente o además, pueden estar presentes secuencias de aminoácidos que estimulan la respuesta inmunológica. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención que codifican un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende, además, al menos otro antígeno, p. ej., la proteína E2 del VPH o al menos un epítipo, pero preferiblemente más epítopos del mismo. Una ventaja de la adición del antígeno E2 para la presente invención es que se sabe que E2 se expresa en una fase temprana durante la infección/en lesiones de bajo grado en que la expresión de E6 y E7 es todavía muy baja. Durante el desarrollo hacia el cáncer cervical se pierde la expresión de E2 y como resultado aumentan los niveles de E6 y E7 (Yugawa y Kiyono, 2009, *Rev Med Virol* 19: 97–113). La combinación de los epítopos de E2, E6 y E7 en una vacuna permite el tratamiento en un amplio grupo diana de pacientes que oscila entre los que tienen una infección persistente a cáncer cervical invasivo (u otros cánceres provocados por VPH16). En determinadas realizaciones, la proteína E2 es una proteína E2 de tipo salvaje. En otras determinadas realizaciones, la proteína E2 tiene una delección o una o más mutaciones en su dominio de unión al ADN (en comparación con una proteína E2 de tipo salvaje). La secuencia de la proteína E2 de VPH16 (NP_041328.1) se puede encontrar en la base de datos de proteínas de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) bajo el número NP_041328.1. Se sabe que varios cambios de aminoácidos sencillos en E2 tales como G293V, K299M o C300R en la parte C-terminal de esta proteína derogan la unión al ADN. Una ventaja de utilizar una variante o fragmento de E2 que carece de la capacidad de unión al ADN es que el mismo podría prevenir cambios transcripcionales impredecibles a través de la unión directa al ADN de la célula huésped en las células en las que se expresa. La proteína E2 o parte o variante de la misma se puede añadir internamente, pero preferiblemente al extremo N o al extremo C del polipéptido de la invención que tiene la SEQ ID NO: 1. En una realización, la molécula de ácidos nucleicos de la invención codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 3. En una realización de la misma, la molécula de ácidos nucleicos de la invención comprende la SEQ ID NO: 4. En otra realización, la molécula de ácidos nucleicos de la invención codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 5. En una realización de la misma, la molécula de ácidos nucleicos de la invención comprende la SEQ ID NO: 6.

También es posible hacer fusiones adicionales de los polipéptidos diseñados de la invención con proteínas adicionales, p. ej., las denominadas proteínas soporte tales como Calreticulina, proteína-70 de choque térmico *Mycobacterium Tuberculosis*, IP10 o fragmento C de la toxina del tétano (véase Oosterhuis et al., *Human Gene Ther*, 2012, *supra*, para más ejemplos), que podrían potenciar adicionalmente la respuesta inmunológica a los epítopos de E6 y E7 (y opcionalmente E2) del VPH. Por lo tanto, la invención proporciona también proteínas de fusión adicionales de este tipo y ácidos nucleicos que las codifican.

En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención se incorpora en un vector. Un "vector", tal como se utiliza en esta memoria, es típicamente un vehículo para portar artificialmente material genético extraño a otra célula en donde se puede replicar y/o expresar, y de acuerdo con la invención puede ser cualquier molécula de ácido nucleico que incorpora una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Estas se pueden preparar de acuerdo con técnicas de biología molecular rutinarias tales como clonación. Típicamente, vectores de este tipo se pueden propagar en al menos un tipo de huéspedes adecuados tales como bacterias, levaduras, células de insectos, células de mamíferos y similares. Cuatro tipos principales de vectores son plásmidos, vectores víricos, cósmidos y cromosomas artificiales. El vector por sí mismo es generalmente una secuencia de ADN que consiste en una inserción (transgen); en la presente invención el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de la invención y una secuencia que sirve como la "cadena principal" del vector. El fin de un vector que transfiere información genética a otra célula es típicamente aislar, multiplicar o expresar la inserción en la célula diana. Preferiblemente, la secuencia que codifica el polipéptido está enlazada operativamente a un promotor en el vector. La expresión "operativamente enlazada" pretende dar a entender que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada al promotor de una manera que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej., en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). Secuencias reguladoras de la expresión pueden estar enlazadas operativamente a un transgen. En determinadas realizaciones, los vectores están diseñados para la expresión del transgen en la célula diana, y generalmente tienen una secuencia de promotor que impulsa la expresión del transgen. En determinadas realizaciones, pueden estar presentes uno o más de los elementos de vector utilizados de forma rutinaria tales como secuencias del terminador de la transcripción, secuencias de la cola de poliadenilación, secuencias Kozak, UTRs, origen de la replicación, múltiples sitios de clonación, marcadores genéticos, resistencia a antibióticos y secuencias adicionales, y la persona experta puede diseñar un vector que tenga las propiedades deseadas, p. ej., para la replicación en determinadas células para la propagación y multiplicación del vector, y para la expresión del transgen del vector en células diana en las que se introduce el vector. Vectores que comprenden el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, preferiblemente diseñado para la expresión en células de mamíferos son adecuados como vacunas de acuerdo con la invención. En determinadas realizaciones, un vector de acuerdo con la invención es un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial de levadura, un cromosoma artificial bacteriano, un vector vírico o similares. La persona experta en la técnica conoce diversos promotores que pueden usarse para obtener la expresión de un gen en células huésped. Algunos promotores bien conocidos y muy utilizados para la expresión en células eucarióticas comprenden promotores derivados de virus tales como adenovirus, p. ej., el

promotor E1A, promotores derivados de citomegalovirus (CMV) tales como el promotor inmediato temprano (IE) de CMV (al que se alude en esta memoria como el promotor de CMV) (obtenible, por ejemplo, de ADNpc, Invitrogen), promotores derivados del Virus de los Simios 40 (SV40) (p. Ej., obtenible de pIRES, nº cat. 631605, BD Sciences), y similares. Promotores adecuados también se pueden derivar de células eucarióticas tales como promotores de metalotioneína (MT), promotor del factor de elongación 1 α (EF-1 α), promotor de ubiquitina C o UB6, promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, promotores de choque térmico, y similares (véase, p. ej., el documento WO 2006/048459). Un ejemplo no limitante de un promotor adecuado para obtener la expresión en células eucarióticas es un promotor de CMV (documento US 5,385,839), p. ej., el el promotor inmediato temprano (IE) de CMV, por ejemplo, que comprende nt. -735 a +95 del potenciador/promotor del gen inmediato temprano de CMV tal como se proporciona en esta memoria con una secuencia como la recogida en la SEQ ID NO: 13. Una señal de poliadenilación, por ejemplo, la señal poliA de la hormona del crecimiento bovina (documento US 5,122,458) puede estar presente del o de los transgenes.

También se pueden añadir secuencias reguladoras adicionales. La expresión "secuencia reguladora" se utiliza de manera indistinta con "elemento regulador" en esta memoria y se refiere a un segmento de ácido nucleico, típicamente pero no limitado al ADN, que modula la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a la que está operativamente enlazado y, por lo tanto, actúa como un modulador de la transcripción. Una secuencia reguladora comprende a menudo secuencias de ácidos nucleicos que son dominios de unión de la transcripción que son reconocidos por los dominios de unión a ácidos nucleicos de proteínas transcripcionales y/o factores, potenciadores o represores de la transcripción, etc. Por ejemplo, es posible acoplar operativamente una secuencia de represor al promotor, secuencia de represor que puede ser unida por una proteína represora que puede disminuir o prevenir la expresión del transgen en una línea celular de producción que expresa esta proteína represora. Esto puede mejorar los niveles de estabilidad y/o expresión genética de la molécula de ácido nucleico tras el paso y/o cuando se produce en grandes cantidades en la línea celular de producción. Sistemas de este tipo se han descrito en la técnica. Por ejemplo, una secuencia reguladora podría incluir una o más secuencias del operador del operón de tetraciclina (tetO), de modo que la expresión es inhibida en presencia de la proteína represora del operón de tetraciclina (tetR). En ausencia de tetraciclina, la proteína tetR es capaz de unirse a los sitios tetO y reprimir la transcripción de un gen operativamente enlazado a los sitios tetO. Sin embargo, en presencia de tetraciclina, un cambio conformacional en la proteína tetR evita que se una a las secuencias de operador, permitiendo que se produzca la transcripción de genes operativamente enlazados. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico, p. ej., cuando está presente en un vector de adenovirus recombinante, de la presente invención puede incluir opcionalmente tetO operativamente enlazado a un promotor, de manera que la expresión de uno o más transgenes es inhibida en adenovirus recombinantes que se producen en la línea celular productora en la que se expresa la proteína tetR. Posteriormente, la expresión no sería inhibida si el adenovirus recombinante se introduce en un sujeto o en células que no expresan la proteína tetR (p. ej., solicitud de patente internacional WO 07/ 073513). En determinadas otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la presente invención, p. ej., cuando está presente en un adenovirus recombinante, puede incluir opcionalmente un sistema de interruptor de genes cumate, en el que la regulación de la expresión es mediada por la unión del represor (CymR) al sitio del operador (CuO), dispuesto aguas abajo del promotor (p. Ej., Mullick et al. *BMC Biotechnol.* 2006 6:43). Tal como se utiliza en esta memoria, el término "represor" se refiere a entidades (p. ej., proteínas u otras moléculas) que tienen la capacidad de inhibir, interferir, retardar y/o reprimir la producción de un producto proteico heterólogo de un vector de expresión recombinante. Por ejemplo, al interferir con un sitio de unión en un lugar apropiado a lo largo del vector de expresión tal como en una casete de expresión. Ejemplos de represores incluyen tetR, CymR, el represor lac, el represor trp, el represor gal, el represor lambda, y otros represores apropiados conocidos en la técnica. Ejemplos del uso del sistema de operador/represor tetO/tetR del sistema CuO/CymR/operador/represor se proporcionan en esta memoria. La represión de la expresión del transgen del vector durante la propagación del vector puede prevenir la inestabilidad del transgen y puede aumentar los rendimientos de vectores que tienen un transgen de la invención durante la producción. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los vectores de la invención tienen un promotor que puede ser reprimido mediante la unión de una proteína represora, p. ej., al tener un promotor que está operativamente acoplado a una secuencia del operador represor (p. ej., en realizaciones no limitantes, una secuencia que contiene TetO, p. ej., la recogida en la SEQ ID NO: 11, o una secuencia que contiene CuO, p. ej., la recogida en la SEQ ID NO: 12), a la que se puede unir una proteína represora (p. ej., la proteína TetR, p. ej., que tiene una secuencia de aminoácidos como la recogida en la SEQ ID NO: 15, o la proteína represora CymR, p. ej., que tiene una secuencia de aminoácidos como la recogida en la SEQ ID NO: 17).

En determinadas realizaciones, el vector es una molécula de ADN de plásmido o un fragmento de la misma. Estos se pueden utilizar para la vacunación con ADN. Para uso como vectores son también posibles otras plataformas, por ejemplo, las cepas de *Listeria monocytogenes* doblemente suprimidas y atenuadas vivas.

En otras realizaciones, el vector es un vector viral recombinante, que puede ser competente en la replicación o deficiente en la replicación. En determinadas realizaciones, un vector viral comprende un genoma de ADN recombinante. En determinadas realizaciones, un vector de acuerdo con la invención es, por ejemplo, un adenovirus recombinante, un retrovirus recombinante, un poxvirus recombinante tal como un virus vacuna (p. ej., Vacuna Ankara Modificada (MVA)), un alfavirus recombinante tal como el virus del bosque Semliki, un paramixovirus recombinante tal como un virus del sarampión recombinante, u otro virus recombinante. En determinadas realizaciones, un vector de acuerdo con la invención es un vector de MVA.

En realizaciones preferidas, un vector de acuerdo con la invención es un adenovirus recombinante. Ventajas de adenovirus para uso como vacunas incluyen a facilidad de manipulación, buena aptitud para la fabricación a gran escala y se ha informado de un excelente registro de seguridad basado en muchos años de experiencia en la investigación, el desarrollo, la fabricación y los ensayos clínicos con numerosos vectores adenovirales. Vectores adenovirales que se utilizan como vacunas proporcionan generalmente una buena respuesta inmunológica a la proteína codificada por el transgen, incluyendo una respuesta inmunológica celular. Un vector adenoviral de acuerdo con la invención se puede basar en cualquier tipo de adenovirus, y en determinadas realizaciones es un adenovirus humano que puede ser de cualquier serotipo. En otras realizaciones, es un adenovirus de simios tal como adenovirus de chimpancé o gorila, que puede ser de cualquier serotipo. En determinadas realizaciones, un vector de acuerdo con la invención es un adenovirus humano serotipo 5, 26 o 35. La preparación de vectores adenovirales recombinantes es muy conocida en la técnica. En determinadas realizaciones, un vector adenoviral de acuerdo con la invención es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1, p. ej., la región E1a y/o la región E1b del genoma adenoviral que se requiere para la replicación viral. En determinadas realizaciones, un vector adenoviral de acuerdo con la invención es deficiente en al menos parte de la región E3 no esencial. En determinadas realizaciones, el vector adenoviral es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1 y al menos parte de la región E3 no esencial.

Vectores adenovirales, métodos para la construcción de los mismos y métodos para la propagación de los mismos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N^{os} 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191 y 6,113,913, y Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Capítulos 67 y 68, respectivamente, en *Virology*, B. N. Fields *et al.*, *comps.*, 3^a ed., Raven Press, Ltd., Nueva York (1996), y otras referencias mencionadas en ella. Típicamente, la construcción de vectores adenovirales implica el uso de técnicas convencionales de biología molecular tales como las descritas, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson *et al.*, *Recombinant DNA*, 2^a ed., Scientific American Books (1992) y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), y otras referencias mencionadas en ellas.

Serotipos particularmente preferidos para el adenovirus recombinante son el serotipo 35 humano o el serotipo 26 humano. La preparación de vectores rAd26 se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/104792 y en Abbink *et al.*, 2007 *Virology* 81: 4654-63. Las secuencias del genoma a modo de ejemplo de Ad26 se pueden consultar en GenBank Acceso EF 153474 y en la SEQ ID NO: 1 del documento WO 2007/104792. La preparación de vectores rAd35 se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N^o 7,270,811, en el documento WO 00/70071 y en Vogels *et al.*, 2003, *J Virol* 77: 8263-71. Secuencias de genoma a modo de ejemplo de Ad35 se encuentran en GenBank Acceso AC_000019 y en la Fig. 6 del documento WO 00/70071.

En determinadas realizaciones, el adenovirus es deficiente en la replicación, p. ej., debido a que contiene una delección en la región E1 del genoma. Como es conocido por la persona experta, en el caso de delecciones de regiones esenciales del genoma de adenovirus, las regiones codificadas por estas regiones han de ser proporcionadas in trans, preferiblemente por la célula productora, es decir, cuando parte o la totalidad de las regiones E1, F2 y/o E4 se suprimen del adenovirus, éstas han de estar presentes en la célula productora, por ejemplo, integrada en el genoma de la misma, o en forma de los denominados adenovirus cooperadores o plásmidos cooperadores. El adenovirus puede tener también una delección en la región E3, que es prescindible para la replicación y, por lo tanto, una delección de este tipo no necesita ser complementada.

Una célula productora (a la que a veces se alude también en la técnica y en esta memoria como 'célula de empaquetamiento' o 'célula complementaria') que se puede utilizar, puede ser cualquier célula productora en la que se pueda propagar un adenovirus deseado. Por ejemplo, la propagación de vectores de adenovirus recombinantes se realiza en células productoras que complementan deficiencias en el adenovirus. Tales células productoras tienen preferiblemente en su genoma al menos una secuencia de adenovirus E1 y, con ello, son capaces de complementar adenovirus recombinantes con una delección en la región E1. Se puede utilizar cualquier célula productora que complemente E1 tal como células de la retina humana inmortalizadas por E1, p. ej., células 911 o PER.C6 (véase la patente de EE.UU. 5,994,128), amniocitos transformados con E1 (Véase la patente EP 1230354), células A549 transformadas con E1 (véanse, p. ej., el documento WO 98/39411, patente de EE.UU. 5,891,690), GH329:HeLa (Gao *et al.*, 2000, *Hum Gene Ther* 11: 213-19), 293, y similares. En determinadas realizaciones, las células productoras son, por ejemplo, células HEK293 o células PER.C5 o células 911 o células IT293SF, y similares. La producción de vectores adenovirales en células productoras se revisa en (Kovesdi *et al.*, 2010, *Viruses* 2: 1681-703).

En determinadas realizaciones, un adenovirus deficiente en E1 comprende la secuencia codificante E4-orf6 de un adenovirus del subgrupo C tal como Ad5. Esto permite la propagación de tales adenovirus en líneas celulares complementarias bien conocidas que expresan los genes E1 de Ad5 tales como, por ejemplo, células 293 o células PER.C6 (véase, p. ej. Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87: 2135-43; WO 03/104467, incorporado en su totalidad como referencia en esta memoria).

"Ácido nucleico heterólogo" (al que también se alude en esta memoria como 'transgen') en vectores de la invención es ácido nucleico que no está presente de forma natural en el vector, y de acuerdo con la presente invención el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de la invención se considera heterólogo cuando está presente en un

vector. Se introduce en el vector, por ejemplo, mediante técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, se puede clonar en una región E1 o E3 suprimida de un vector adenoviral, o en la región entre la región E4 y rITR. Un transgen está generalmente enlazado operativamente a secuencias de control de la expresión. En realizaciones preferidas, el transgen se clona en la región E1 de un vector adenoviral.

5 La producción de vectores tales como vectores de ADN o vectores de adenovirus recombinante se puede realizar de acuerdo con diversos métodos bien conocidos por la persona experta en la técnica. Generalmente, la producción incluye la propagación en células cultivadas para generar una cantidad sustancial de material del vector, seguido de la recogida del vector del cultivo celular, y seguido típicamente por una purificación adicional del vector para separar otras sustancias y obtener vectores purificados que se pueden formular en composiciones farmacéuticas (p. ej., Hoganson *et al.*, 2002, *BioProcessing J* 1: 43-8; Evans *et al.*, 2004, *J Pharm Sci* 93:2458-75). Por ejemplo, métodos para recolectar adenovirus de cultivos de células productoras se han descrito ampliamente, por ejemplo, en el documento WO 2005/080556. Por ejemplo, los documentos WO 2010/060719 y WO 2011/098592, ambos incorporados como referencia en esta memoria, describen métodos adecuados para obtener y purificar grandes cantidades de adenovirus recombinantes.

10 En determinados aspectos, la invención proporciona también un polipéptido que es codificado por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Un polipéptido de este tipo comprende la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, un polipéptido de este tipo puede comprender la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. Las características de un polipéptido de este tipo son como se describen arriba. Un polipéptido de este tipo se puede utilizar, por ejemplo, directamente como una vacuna contra el VPH.

15 La invención proporciona, además, vacunas que comprenden moléculas de ácidos nucleicos, vectores o polipéptidos de acuerdo con la invención, en donde realizaciones de cada uno de estos aspectos pueden incluir las descritas arriba. En realizaciones preferidas, una vacuna de acuerdo con la invención comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. En realizaciones preferidas adicionales, la vacuna comprende un vector de acuerdo con la invención, preferiblemente un vector de ADN, un vector de MVA o un vector de adenovirus recombinante.

20 En determinadas realizaciones, una vacuna de acuerdo con la invención comprende ingredientes activos adicionales, p. ej., ácido nucleico que codifica al menos un epítipo de proteína E6 y/o E7 de al menos un tipo de VPH diferente de VPH16, p. ej., un tipo de VPH de alto riesgo tal como VPH18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 u -82.

25 El término "vacuna" se refiere a un agente o composición que contiene un componente activo, eficaz para inducir un grado de inmunidad profiláctico y/o terapéutico en un sujeto contra un determinado patógeno o enfermedad, en este caso, terapéuticamente contra el VPH. La vacuna comprende típicamente la molécula de ácido nucleico, o vector, de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tras la administración a un sujeto, el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención será expresado en el sujeto, lo cual conducirá a una respuesta inmunológica hacia fragmentos antigénicos de E6 y/o E7 que están presentes en el polipéptido. La ventaja de las presentes moléculas es que están presentes esencialmente todos los epítopos de células T de E6 y E7 de VPH16 y, por lo tanto, una respuesta de células T a cualquier epítipo presente en E6 o E7 de tipo salvaje se puede montar en la vacuna. Además, la vacuna tiene todas las ventajas de seguridad y eficacia esbozadas anteriormente para las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención.

30 Para la administración a seres humanos, la invención puede emplear composiciones farmacéuticas que comprenden el vector y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el soporte o excipiente, a las dosificaciones y concentraciones empleadas, no provocará efectos indeseados o perjudiciales en los sujetos a los que se administra. Excipientes farmacéuticamente aceptables de este tipo son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Un excipiente es generalmente una sustancia farmacológicamente inactiva formulada con el ingrediente activo de una medicación. Los excipientes se utilizan habitualmente para dar consistencia a las formulaciones que contienen potentes ingredientes activos (así aludidos a menudo como "agentes conferidores de consistencia", "cargas" o "diluyentes") para permitir una dispensación conveniente y precisa de una sustancia farmacológica cuando se produce una forma de dosificación. También pueden servir para diversos fines potenciadores terapéuticos tales como facilitar la absorción o solubilidad del fármaco, u otras consideraciones farmacocinéticas. Los excipientes también pueden ser útiles en el proceso de fabricación para ayudar en la manipulación de la sustancia activa en cuestión tal como facilitando las propiedades de fluidez del polvo o de no pegajosidad, además de ayudar a la estabilidad *in vitro* tal como la prevención de la desnaturalización a lo largo de la vida útil esperada. La selección de excipientes apropiados depende también de la vía de administración y de la forma de dosificación, así como del ingrediente activo y de otros factores.

35 La molécula de ácido nucleico purificada, vector o polipéptido se formula y administra preferiblemente en forma de una disolución estéril, aunque también es posible utilizar preparados liofilizados. Las disoluciones estériles se preparan por filtración estéril o mediante otros métodos conocidos per se en la técnica. Las disoluciones se liofilizan o cargan a continuación en recipientes de dosificación farmacéuticos. El pH de la disolución está generalmente en el intervalo de

pH 3.0 a 9.5, p. ej., pH 5.0 a 7.5. La molécula de ácido nucleico o vector o polipéptido está típicamente en una disolución que tiene un tampón adecuado, y la disolución de vector puede contener también una sal. Opcionalmente, puede estar presente un agente estabilizante tal como albúmina. En determinadas realizaciones, se añade detergente. En determinadas realizaciones, la vacuna se puede formular en un preparado inyectable. Estas formulaciones que contienen cantidades eficaces de molécula de ácido nucleico, vector o polipéptido son disoluciones líquidas, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas estériles y, opcionalmente, contienen estabilizadores o excipientes.

Por ejemplo, vector de adenovirus recombinante se puede almacenar en el tampón que también se puede utilizar para el Patrón Mundial de Adenovirus (Hoganson *et al.*, 2002, *Bioprocessing J* 1: 43-8): Tris 20 mM pH 8, NaCl 25 mM, 2.5% de glicerol. Otro tampón de formulación útil, adecuado para la administración a seres humanos es Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 25 mM, sacarosa al 10% p/v, polisorbato-80 al 0.02% p/v. Otro tampón de formulación que es adecuado para el adenovirus recombinante comprende tampón citrato 10-25 mM pH 5.9-6.2, 4-6% (p/p) de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD), NaCl 70-100 mM, 0.018-0.035% (p/p) de polisorbato-80 y opcionalmente 0.3-0.45% (p/p) de etanol. Obviamente, se pueden utilizar muchos otros tampones y existe constancia de varios ejemplos de formulaciones adecuadas para el almacenamiento y para la administración farmacéutica de vectores purificados.

En determinadas realizaciones, una composición que comprende el vector comprende, además, uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son conocidos en la técnica por aumentar adicionalmente la respuesta inmunológica a un determinante antigénico aplicado. El término "adyuvante" y la expresión "estimulante inmunitaria" se utilizan indistintamente en la presente y se definen como una o más sustancias que provocan la estimulación del sistema inmunitario. En este contexto, un adyuvante se utiliza para potenciar una respuesta inmune al polipéptido codificado por las moléculas en los vectores de la invención. Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio y/o fosfato de aluminio y potasio; composiciones de emulsión en aceite (o composiciones de aceite en agua), incluyendo emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 (véase, p. ej., el documento WO 90/14837); formulaciones de saponina tales como, por ejemplo QS21 y Complejos Inmunoestimulantes (ISCOMS) (véanse, p. ej., los documentos US 5,057,540; WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); derivados bacteriano o microbianos, ejemplos de los cuales son monofosforil lípido A (MPL), MPL 3-O-deacilado (3dMPL), oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, toxinas bacterianas ADP-ribosilantes o mutantes de los mismos, tales como *E. coli* enterotoxina térmicamente labil LT, toxina del cólera CT, y similares. También es posible utilizar un adyuvante codificado por un vector, p. ej., utilizando ácido nucleico heterólogo que codifica una fusión del dominio de oligomerización de la proteína de unión a C4 (C4bp) al antígeno de interés (p. ej., Solabomi *et al.*, 2008, *Infect Immun* 76: 3817-23), o utilizando un vector que codifica tanto el transgen de interés como un agonista de TLR-3 tal como ARNs heterólogo (p. ej., documento WO 2007/100908), o similar.

En otras realizaciones, las composiciones de la invención no comprenden adyuvantes.

Composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto, p. ej., un sujeto humano. La dosis total de componente activo de vacuna proporcionada a un sujeto durante una administración puede variarse como es conocido por el médico experto, y para adenovirus oscila generalmente entre 1x10⁷ partículas víricas (vp) y 1x10¹² vp, preferiblemente entre 1x10⁸ vp y 1x10¹¹ vp, por ejemplo, entre 3x10⁸ y 5x10¹⁰ vp, por ejemplo, entre 10⁹ y 3x10¹⁰ vp. Para una vacuna de ADN, cantidades totales de ADN por administración pueden oscilar, por ejemplo, entre 1 µg y 10 mg. Si se utiliza una pistola de genes para la administración, se utilizan típicamente bajas cantidades, p. ej., 10 µg. Para la inyección intramuscular se utilizan típicamente cantidades mayores, p. ej., de hasta 5 mg.

La administración de composiciones farmacéuticas se puede realizar utilizando vías de administración convencionales. Realizaciones no limitantes incluye la administración parenteral tal como mediante inyección, p. ej., intradérmica, intramuscular, etc., o subcutánea o transcutánea, o la administración mucosal, p. ej., intranasal, oral, rectal, y similares. En una realización, una composición se administra mediante inyección intramuscular, p. ej., en el músculo deltoide del brazo o en el músculo vasto lateral del muslo. En determinadas realizaciones, la vacuna es una vacuna de ADN y ésta se puede administrar, por ejemplo, por vía intradérmica, p. ej., mediante tatuaje de ADN (véase, p. ej., Oosterhuis *et al.*, 2012, *Curr Top Microbiol Immunol* 351: 221-50). Esta vía también es factible para vectores adenovirales. En determinadas realizaciones, una composición de acuerdo con la invención comprende un vector adenoviral y se administra mediante inyección intramuscular. La persona experta conoce las diversas posibilidades de administrar una composición tal como una vacuna, con el fin de inducir una respuesta inmunológica al o a los antígenos en la vacuna.

Un sujeto, tal como se utiliza en esta memoria, es preferiblemente un mamífero, por ejemplo, un roedor, p. ej., un ratón, o un primate no humano, o ser humano. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano.

Las vacunas de la invención se pueden utilizar para tratar pacientes que tienen una de diversas fases de enfermedades provocadas por el VPH (en particular tipo 16), de infección incidente y persistente por VPH como tal (p. ej., tal como se detecta mediante ensayo del ADN de VPH), por lo tanto antes de que se formen lesiones (pre-)cancerosas, así como neoplasia intraepitelial cervical (CIN; también conocida como displasia cervical y neoplasia intersticial cervical que es la transformación potencialmente pre-maligna y el crecimiento anormal (displasia) de células escamosas sobre la superficie del cuello uterino) hasta y que incluye el cáncer cervical (tal como carcinoma de células escamosas cervical (SCC)). Además, se pueden fijar como objetivo otras neoplasias inducidas por el VPH tales como neoplasia intraepitelial vulvar (VIN), neoplasia intraepitelial vaginal (VaIN), neoplasia intraepitelial del pene (PIN), neoplasia intraepitelial anal (AIN), así como fases más avanzadas de cáncer orofaríngeo (también conocido como cáncer de

cabeza y cuello), cáncer del pene, cáncer vaginal, cáncer vulvar y cáncer anal. Las vacunas de la invención pueden, por lo tanto, fijar como objetivo una amplia gama de lesiones inducidas por el VPH, y probablemente son lo más eficaces en las fases pre-cancerosas de enfermedad inducida por el VPH, p. ej., en las fases de infección (persistente) y/o de neoplasia, en donde la expresión de E2, E6 y/o E7 es la más alta. También es posible combinar el tratamiento utilizando una vacuna de la invención con compuestos que contrarrestan o pueden superar mecanismos de escape inmunológicos en células cancerosas avanzadas, p. ej., anticuerpos anti-PD1/PD-L1, anticuerpos anti-CTLA-4 tales como Ipilimumab, anticuerpos anti-LAG-3, anticuerpos anti-CD25, inhibidores deIDO, anticuerpos agonísticos CD40, anticuerpos agonísticos CD137, etc. (Véase, p. ej., Hamid y Carvajal, 2013, *Expert Opinion Biol Ther* 13: 847-861; Mellman *et al.*, 2011, *Nature Rev* 480: 480-89). El método de vacunación terapéutico podría utilizarse, en principio también para tratar verrugas genitales externas o precursores de las mismas en el caso de que la vacuna comprenda (secuencias codificantes de) E6 y/o E7 adicionales de un tipo de VPH que provoca verrugas genitales externas y se administran a un sujeto infectado por este tipo de VPH.

Tal como se utiliza en esta memoria, 'tratamiento' significa la administración de la vacuna para inducir una respuesta inmunológica terapéutica contra células que expresan (epítomos de) E6 y/o E7 de VPH16 en el paciente, que conduce a al menos una reducción del nivel y preferiblemente una eliminación completa de la infección por VPH16, que resulta en al menos una ralentización y preferiblemente la detención del progreso de la enfermedad provocada por el VPH16 tal como neoplasias y/o síntomas de las mismas. Preferiblemente, el tratamiento con la vacuna resulta también en la remisión de fases más avanzadas de cánceres inducidos por el VPH. Se prefiere administrar la vacuna a pacientes que tengan una infección por el VPH establecida que haya sido tipificada, de modo que se puede administrar la vacuna que codifica el polipéptido del correspondiente tipo de VPH. En ausencia de un rastreo, la vacuna también se puede administrar en parte de la población que es probable que esté infectada por el VPH, es decir, personas sexualmente activas. También es posible administrar una vacuna de la invención a sujetos que no hayan sido infectados por el VPH16, p. ej., para uso profiláctico, posiblemente en combinación con una vacuna contra otro tipo de VPH con el cual el paciente haya sido infectado o, alternativamente, en sujetos no infectados. Una vacuna de la invención también se puede administrar a un sujeto que es sometido a tratamiento adicional por otros medios, p. ej., cirugía (eliminación) de una lesión provocada por una infección por el VPH16) o tratamiento con imiquimod (que comprende un agonista de TLR-7/8, véase, p. ej., Dayaana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129 – 36). El efecto del tratamiento puede medirse por citología o por ensayo del VPH.

La vacunación comprende administrar la vacuna de la invención a un sujeto o paciente, al menos una vez. También es posible proporcionar una o más administraciones de refuerzo de una o más vacunas adicionales. Si se realiza una vacunación de refuerzo, típicamente dicha vacunación de refuerzo será administrada al mismo sujeto en un momento entre una semana y un año, preferiblemente entre dos semanas y cuatro meses, después de administrar una composición inmunogénica con el mismo antígeno al sujeto por vez primera (que en tales casos se denomina 'vacunación de sensibilización'). En regímenes de refuerzo alternativos, es posible también administrar diferentes vectores, p. ej., uno o más adenovirus de diferente serotipo, u otros vectores tales como MVA, o ADN, o proteína, al sujeto como una vacunación principal o de refuerzo. En determinadas realizaciones, la misma forma de una vacuna de la invención se administra al menos dos veces al mismo paciente en un régimen de sensibilización-refuerzo, p. ej., con el mismo adenovirus recombinante (tal como Ad26) de acuerdo con la invención. En determinadas realizaciones, una vacuna de la invención se administra al menos dos veces en un régimen principal-de refuerzo, pero el vector de la vacuna es diferente, p. ej., se utilizan dos serotipos diferentes de vectores adenovirales, p. ej., sensibilizando con Ad26 recombinante y reforzando con Ad35 recombinante, o viceversa; o sensibilizando con ADN y reforzando con un vector adenoviral, o viceversa; o sensibilizando con un vector adenoviral y reforzando con un vector MVA, o viceversa. En determinadas realizaciones, una vacuna de acuerdo con la invención se administra al menos tres veces en un régimen de sensibilización-refuerzo-refuerzo. Administraciones de refuerzo adicionales podrían añadirse al régimen.

También es un aspecto de la invención inducir una respuesta de CTL contra VPH16 en un sujeto, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con la invención al sujeto.

La invención proporciona también las siguientes realizaciones no limitantes:

1) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1;

2) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, en donde el polipéptido comprende, además, al menos parte de proteína E2 del VPH;

3) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 2, en donde la al menos parte de la proteína E2 del VPH es de la proteína E2 de VPH16;

4) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 2, en donde el polipéptido comprende al menos parte de la proteína E2 condensada al lado N-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;

5) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 2, en donde el polipéptido comprende al menos parte de la proteína E2 condensada al lado C-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;

6) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 3, en donde el polipéptido comprende al menos parte de la proteína E2 condensada al lado N-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;

- 7) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 3, en donde el polipéptido comprende al menos parte de la proteína E2 condensada al lado C-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;
- 8) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 2, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 5 9) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 3, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 10) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 4, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 10 11) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 5, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 12) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 6, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 13) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 7, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 15 14) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 15) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 2, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 20 16) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 3, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 17) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 4, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 18) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 5, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 25 19) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 6, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 20) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 7, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 30 21) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 8, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 22) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 9, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 23) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 10, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 35 24) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 11, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 25) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 12, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 40 26) un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 13, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 27) un vector de acuerdo con la realización 14, en donde el vector es un adenovirus;
- 28) un vector de acuerdo con la realización 15, en donde el vector es un adenovirus;
- 29) un vector de acuerdo con la realización 16, en donde el vector es un adenovirus;
- 30) un vector de acuerdo con la realización 17, en donde el vector es un adenovirus;
- 45 31) un vector de acuerdo con la realización 18, en donde el vector es un adenovirus;
- 32) un vector de acuerdo con la realización 19, en donde el vector es un adenovirus;
- 33) un vector de acuerdo con la realización 20, en donde el vector es un adenovirus;
- 34) un vector de acuerdo con la realización 21, en donde el vector es un adenovirus;
- 35) un vector de acuerdo con la realización 22, en donde el vector es un adenovirus;

- 36) un vector de acuerdo con la realización 23, en donde el vector es un adenovirus;
- 37) un vector de acuerdo con la realización 24, en donde el vector es un adenovirus;
- 38) un vector de acuerdo con la realización 25, en donde el vector es un adenovirus;
- 39) un vector de acuerdo con la realización 26, en donde el vector es un adenovirus;
- 5 40) un vector de acuerdo con la realización 27, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 41) un vector de acuerdo con la realización 28, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 42) un vector de acuerdo con la realización 29, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 43) un vector de acuerdo con la realización 30, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 44) un vector de acuerdo con la realización 31, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 10 45) un vector de acuerdo con la realización 32, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 46) un vector de acuerdo con la realización 33, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 47) un vector de acuerdo con la realización 34, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 48) un vector de acuerdo con la realización 35, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 49) un vector de acuerdo con la realización 36, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 15 50) un vector de acuerdo con la realización 37, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 51) un vector de acuerdo con la realización 38, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 52) un vector de acuerdo con la realización 39, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 53) un vector de acuerdo con la realización 28, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 54) un vector de acuerdo con la realización 29, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 20 55) un vector de acuerdo con la realización 30, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 56) un vector de acuerdo con la realización 31, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 57) un vector de acuerdo con la realización 32, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 58) un vector de acuerdo con la realización 33, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 59) un vector de acuerdo con la realización 34, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 25 60) un vector de acuerdo con la realización 35, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 61) un vector de acuerdo con la realización 36, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 62) un vector de acuerdo con la realización 37, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 63) un vector de acuerdo con la realización 38, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 64) un vector de acuerdo con la realización 39, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 30 65) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 14 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 66) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 35 67) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 68) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 69) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 18 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 40 70) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 19 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 71) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 20 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 45 72) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 21 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;

- farmacéuticamente aceptable;
- 99) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 48 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 5 100) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 49 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 101) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 50 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 102) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 51 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 10 103) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 52 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 104) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 53 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 15 105) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 54 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 106) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 55 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 107) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 56 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 20 108) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 57 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 109) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 58 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 25 110) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 59 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 111) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 60 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 112) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 61 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 30 113) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 62 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 114) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 63 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 35 115) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 64 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 116) un método para inducir una respuesta inmunológica contra VPH en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115;
- 117) un método para tratar una infección persistente por VPH, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece infecciones persistentes por VPH;
- 40 118) un método para tratar una neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece VIN;
- 119) un método para tratar un cáncer vulvar (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece cáncer vulvar;
- 45 120) un método para tratar una neoplasia intraepitelial cervical (CIN) (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece CIN;
- 121) un método para tratar un cáncer cervical (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece cáncer cervical;
- 50 122) un método para tratar un cáncer orofaríngeo (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece cáncer orofaríngeo;

- 123) un método para tratar una neoplasia intraepitelial del pene (PIN) (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece PIN;
- 5 124) un método para tratar un cáncer del pene (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece cáncer del pene;
- 125) un método para tratar una neoplasia intraepitelial vaginal (VaIN) (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece VaIN;
- 10 126) un método para tratar un cáncer vaginal (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece cáncer vaginal;
- 127) un método para tratar una neoplasia intraepitelial anal (AIN) (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece AIN;
- 15 128) un método para tratar un cáncer anal (con infección subyacente por VPH tipo 16), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 65-115 a un sujeto que padece cáncer anal;
- 129) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1;
- 130) un polipéptido de acuerdo con la realización 129, en donde el polipéptido comprende, además, al menos parte de proteína E2 del VPH;
- 20 131) un polipéptido de acuerdo con la realización 130, en donde la al menos parte de la proteína E2 del VPH es de la proteína E2 de VPH16;
- 132) un polipéptido de acuerdo con la realización 130, en donde la al menos parte de la proteína E2 está condensada al lado N-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;
- 133) un polipéptido de acuerdo con la realización 130, en donde la al menos parte de la proteína E2 está condensada al lado C-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;
- 25 134) un polipéptido de acuerdo con la realización 131, en donde la al menos parte de la proteína E2 está condensada al lado N-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;
- 135) un polipéptido de acuerdo con la realización 131, en donde la al menos parte de la proteína E2 está condensada al lado C-terminal del polipéptido con la SEQ ID NO: 1;
- 30 136) un polipéptido de acuerdo con la realización 130, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 137) un polipéptido de acuerdo con la realización 131, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 138) un polipéptido de acuerdo con la realización 132, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 35 139) un polipéptido de acuerdo con la realización 133, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 140) un polipéptido de acuerdo con la realización 134, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 40 141) un polipéptido de acuerdo con la realización 135, en donde la al menos parte de la proteína E2 comprende una variante de la proteína E2 con una mutación que abole la unión al ADN de E2;
- 142) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 3, que codifica un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 3;
- 143) un ácido nucleico de acuerdo con la realización 3, que codifica un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 5;
- 144) un vector que codifica un ácido nucleico de acuerdo con la realización 142, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 45 145) un vector que codifica un ácido nucleico de acuerdo con la realización 143, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor;
- 146) un vector de acuerdo con la realización 144, en donde el vector es un adenovirus;
- 147) un vector de acuerdo con la realización 145, en donde el vector es un adenovirus;
- 148) un vector de acuerdo con la realización 146, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;
- 50 149) un vector de acuerdo con la realización 147, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26;

- 150) un vector de acuerdo con la realización 146, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 151) un vector de acuerdo con la realización 147, en donde el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35;
- 152) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 144 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 5 153) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 145 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 154) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 146 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 155) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 147 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 10 156) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 148 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 157) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 149 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 15 158) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 150 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 159) una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con la realización 151 y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 20 160) un método para inducir una respuesta inmunológica contra VPH en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159;
- 161) un método para tratar una neoplasia intraepitelial vulvar (VIN), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece VIN;
- 162) un método para tratar un cáncer vulvar, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece cáncer vulvar;
- 25 163) un método para tratar una neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece CIN;
- 164) un método para tratar un cáncer cervical, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece cáncer cervical;
- 30 165) un método para tratar un cáncer orofaríngeo, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece cáncer orofaríngeo;
- 166) un método para tratar una neoplasia intraepitelial del pene (PIN), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece PIN;
- 167) un método para tratar un cáncer del pene, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece cáncer del pene;
- 35 168) un método para tratar una neoplasia intraepitelial vaginal (VaIN), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece VaIN;
- 169) un método para tratar un cáncer vaginal, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece cáncer vaginal;
- 40 170) un método para tratar una neoplasia intraepitelial anal (AIN), que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece AIN;
- 171) un método para tratar un cáncer anal, que comprende administrar una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 152-159 a un sujeto que padece cáncer anal.

La práctica de esta invención empleara, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la técnica. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al., eds, 1987; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR2: A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds, 1988.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no limitan la invención de modo alguno. Meramente sirven para clarificar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un polipéptido diseñador que comprende esencialmente todos los epítomos CTL de E6 y E7 de VPH16

- Los autores de la invención diseñaron un nuevo polipéptido no tumorigénico (y ácido nucleico que codifican el mismo) que contiene esencialmente todos los epítomos CTL de proteínas E6 y E7 de VPH16, y tiene un número mínimo de neo-epítomos fuertes anticipados/predichos (significando neo-epítomos epítomos que no están presentes en las proteínas E6 y E7 de VPH16 de tipo salvaje). El polipéptido de la invención (a los que se alude a veces en esta memoria como 'E6E7SH') comprende una secuencia según se proporciona en la SEQ ID NO: 1. Un ácido nucleico optimizado en codones que codifica este polipéptido se proporciona en la SEQ ID NO: 2.
- Las moléculas de la invención son moléculas sencillas, que proporcionan ventajas de fabricación frente a estrategias en las que se utilizan múltiples moléculas. Además, el polipéptido de la invención comprende esencialmente todos los epítomos CTL supuestos que están presentes en E6 y E7 de tipo salvaje de VPH16, y al mismo tiempo tienen un número mínimo de neo-epítomos fuertes anticipados/predichos que podrían ser potencialmente inmunodominantes y, por lo tanto, desviar la respuesta inmunológica de epítomos CTL de tipo salvaje relevantes. Por lo tanto, las construcciones de la presente invención son inmunológicamente más favorables que las moléculas descritas por otros que carecen de posibles epítomos CTL y/o que contienen más o más fuertes neo-epítomos.
- Por ejemplo, la construcción de SEQ ID NO: 1 contiene sólo un neo-epítomo con una longitud de nueve aminoácidos con una afinidad de unión predicha < 50 nM para los 20 alelos HLA-A más comunes, los 20 alelos HLA-B más comunes y los 20 alelos HLA-C más comunes, (HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*29:02, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:01, HLA-A*33:03, HLA-A*34:01, HLA-A*68:01, HLA-A*68:02, HLA-B*07:02, HLA-B*07:04, HLA-B*08:01, HLA-B*13:01, HLA-B*15:01, HLA-B*18:01, HLA-B*35:01, HLA-B*37:01, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLA-B*40:02, HLA-B*40:06, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*46:01, HLA-B*48:01, HLA-B*51:01, HLA-B*52:01, HLA-B*53:01, HLA-B*58:01, HLA-C*07:02, HLA-C*04:01, HLA-C*03:04, HLA-C*01:02, HLA-C*07:01, HLA-C*06:02, HLA-C*03:03, HLA-C*08:01, HLA-C*15:02, HLA-C*12:02, HLA-C*02:02, HLA-C*05:01, HLA-C*14:02, HLA-C*03:02, HLA-C*16:01, HLA-C*08:02, HLA-C*12:03, HLA-C*04:03, HLA-C*17:01, HLA-C*14:03), según se determina utilizando el método ANN (Lundegaard *et al.*, 2008, *Nucl Acids Res* 36: W509-12) y SMM (Peters *et al.*, 2003, *Bioinformatics* 19: 1765-72) para HLA-A y HLA-B y el método NetMHCpan (Hoof *et al.*, 2009, *Immunogenetics* 61: 1-13) para HLA-C de la herramienta de predicción para 'Unión de péptidos a moléculas de MHC clase I' y la página web de IEDB (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html, versión 2009-09-01B).
- Como un ejemplo no limitante, utilizando la herramienta de predicción SMM en la página web de IEDB, las secuencias de E6 y E7 barajadas, tal como se describen por Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406 y Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93 contienen cada una nueve neo-epítomos únicos fuertes potenciales (ANN o SMM CI50<50 nM) para los 20 más HLA-A y -B en la parte del núcleo. Esto excluye incluso los apéndices utilizados en ese enfoque (en el que los apéndices contribuirán además a neo-epítomos adicionales, y pueden perder más epítomos MHC II nativos debido a la longitud limitada del 'solapamiento'). De hecho, una molécula que se reseña mejorada que contiene una variante con proteínas E6 y E7 barajadas que se describió en el documento WO 2013/083287, contiene 22 neo-epítomos únicos con una longitud de nueve aminoácidos, con una CI50 <50 nM predicha (ANN, SMM o NetMHCpan) para los 20 alelos HLA-A más comunes, los 20 alelos HLA-B más comunes y los 20 alelos HLA-C más comunes.
- Por lo tanto, las moléculas diseñadoras de la invención son claramente favorables al tener un número mucho menor de neo-epítomos predichos en comparación con otros enfoques publicados, en que E6 y E7 fueron barajadas para separar la funcionalidad.
- Se sintetizó ácido nucleico que codifica la molécula E6E7SH de VPH16 así diseñada por los autores de la invención (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 1), comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 2, y está flanqueada por un sitio HindIII y una secuencia Kozak en el extremo 5' y un sitio XbaI en el lado 3' (síntesis habitual y clonación molecular convencional en Invitrogen Life technologies, Alemania).
- Los fragmentos sintetizados se clonaron utilizando HindIII y XbaI en un vector de expresión convencional, pCDNA2004.Neo, que alberga tanto un marcador de resistencia bacteriana (Ampicilina) como un marcador de resistencia a mamíferos (Neomicina) para obtener vectores de plásmidos que codifican una molécula de la invención, p. ej., para experimentos basados en la transfección (transitoria).
- Estas moléculas se podrían utilizar como tales, pero también como la base para moléculas adicionales que contienen características adicionales. Como ejemplos no limitantes, se prepararon algunas variantes adicionales tal como se describe más adelante.
- La secuencia de la proteína de fusión E6E7SH de VPH16 se puede combinar con secuencias de otras proteínas tempranas de VPH16 para fijar como objetivo individuos con una infección persistente y para ampliar el repertorio inmunológico en un individuo inmunizado. Se ha sugerido que respuestas inmunológicas contra E2 juegan un papel importante en el aclaramiento de infecciones por VPH16 (de Jong *et al.*, 2002, *Cancer Res* 62: 472-479). La fusión de

- E2 a E6E7SH dará un componente de vacuna que alberga antígeno contra las fases de cáncer relacionado con el VPH desde infección persistente a cáncer invasivo o enfermedad recurrente/refractaria después de cirugía LEEP. Por lo tanto, como un ejemplo no limitante de estas realizaciones, los autores de la invención prepararon una secuencia que codifica una proteína de fusión de E6E7SH con E2 en su extremo N. En la secuencia de E2 se pueden hacer modificaciones para abolir la actividad de unión al ADN que podría afectar a la expresión génica en células que expresan la proteína de fusión. Los autores de la invención mutaron glicina en la posición 293, lisina en la posición 299 y cisteína en la posición 300 de la proteína E2 wt de VPH16 en respectivamente valina, metionina y arginina. Cada una de estas mutaciones por sí misma ya abola por completo la unión de E2 a secuencias de ADN que albergan dominios de unión de E2 (Prakash et al., 1992, *Genes Dev* 6: 105-16).
- Al polipéptido resultante se le alude como E2E6E7SH de VPH16 y comprende la SEQ ID NO: 3. Se preparó una secuencia optimizada en codones que codifica este polipéptido y se proporciona en la SEQ ID NO: 4.
- Los autores de la invención construyeron también una variante en donde la misma proteína mutante E2 se fusionó al extremo C del polipéptido de fusión E6E7SH de VPH16, dando lugar a un polipéptido al que se alude como E6E7E2SH de VPH16, que comprende la SEQ ID NO: 5. La secuencia que codifica esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 6.
- Para fines de control, los autores de la invención construyeron también secuencias que codifican un polipéptido que contiene las secuencias de tipo salvaje para E6 y E7 de longitud completa de VPH16 como una proteína de fusión (E6 de aa 1 a 158 directamente fusionada a E7 de aa 1 a 98, denominada en esta memoria E6E7wt).
- También sometieron a ensayo el efecto de añadir secuencias conductoras al polipéptido. Como un ejemplo no limitante, una secuencia que codifica una secuencia líder de IgE (véase, p. ej., el documento US 6,733,994) [la secuencia líder del péptido conductor se proporciona en la SEQ ID NO: 7] se fusionó en el extremo N de alguna de las construcciones, p. ej., en la construcción E6E7wt, que proporcionó LSE6E7wt, y en la construcción E2E6E7SH, que proporcionó LSE2E6E7SH. El efecto de la misma potenció significativamente ($p < 0.005$) la inmunogenicidad en comparación con el mismo antígeno sin la secuencia LH tal como se mide mediante el análisis del tetrámero E7 en ratones inmunizados (tal como se puede ver, por ejemplo, en la Fig. 9).
- Las secuencias que codifican los polipéptidos E6E7SH de la invención, con o sin E2, se pueden expresar, por ejemplo, a partir de construcciones de ADN, a partir de ARN o a partir de vectores virales. La Fig. 1 demuestra la expresión en células HEK-293T tras la transfección transitoria con vectores de ADN que expresan los transgenes tal como se describe arriba. Después de la transfección, las células se recolectaron y los extractos celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia western con un anticuerpo contra E7 de VPH16. Este experimento demuestra la expresión de las proteínas de fusión de tamaño apropiado esperadas tras la transfección de los vectores de expresión.
- Vectores adenovirales se pueden utilizar para expresar E6E7, con o sin E2, y con o sin secuencias adicionales para aumentar la inmunogenicidad de la proteína de fusión codificada.
- Los genes que codifican el control E6E7 wt de VPH16 o secuencias diseñadoras del VPH descritas anteriormente fueron optimizados en genes para la expresión humana y fueron sintetizados por Geneart. Una secuencia Kozak (5' GCCACC 3') se incluyó directamente delante del codón de inicio ATG y dos codones de parada (5' TGA TAA 3') se añadieron en el extremo de la secuencia codificante respectiva. Los genes se insertaron en el plásmido pAdApt35BSU y en el plásmido pAdApt26 (Havenga et al., 2006, *J Gen Virol* 87, 2135-43) a través de los sitios HindIII y XbaI.
- Todos los adenovirus fueron generados en células PER.C6 mediante recombinación homóloga sencilla y fueron producidos tal como se describe previamente (para rAd35: Havenga et al., 2006, *J Gen Virol* 87: 2135-43; para rAd26: Abbink et al., 2007, *J Virol* 81: 4654-63). Células PER.C6 (Fallaux et al., 1998, *Hum Gene Ther* 9: 1909-17) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de bovino fetal (FBS) al 10%, complementado con MgCl₂ 10 mM.
- En síntesis, células PER.C6 fueron transfectadas con plásmidos del vector Ad utilizando Lipofectamina de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Life Technologies). Las células se recolectaron un día después de alcanzar el efecto citopático (CPE) completo, se congelaron-descongelaron, se centrifugaron durante 5 min a 3,000 rpm y se almacenaron a -20°C. Los virus se purificaron en placa y se amplificaron en células PER.C6 cultivadas en un solo pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. La amplificación ulterior se llevó a cabo en células PER.C6 cultivadas en un matraz de cultivo tisular T25 y subsiguientemente en un matraz de cultivo tisular T175. Del lisado bruto preparado a partir de las células obtenidas después del matraz T175, se utilizaron 3 a 5 ml para inocular matraces de cultivo tisular de cinco capas 24×T1000 que contenían 70% de capas confluyentes de células PER.C6. El virus se purificó utilizando un método de purificación de CsCl de dos etapas. Finalmente, el virus se almacenó en partes alícuotas a -85°C.
- Ad35.VPH16-E6E7wt y Ad35.VPH16-E6E7SH son vectores de adenovirus recombinante serotipo 35 (Ad35) que comprenden las secuencias de nucleótidos optimizadas en codones para la expresión de, respectivamente, una proteína de fusión de las proteínas E6 y E7 de tipo salvaje (E6E7wt) de VPH16 y una variante de la proteína de fusión diseñadora tal como se describe arriba (E6E7SH que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEQ ID NO: 1). Las secuencias de E6 y E7 combinadas se dispusieron bajo el control de un promotor de CMV en la región E1

del genoma de adenovirus E1,E3 suprimido. Ad26.VPH16-E6E7wt y Ad26.VPH16-E6E7SH son los vectores equivalentes basados en adenovirus recombinante serotipo 26.

De manera similar, se produjeron vectores adenovirales recombinantes basados en Ad26 y Ad35 que codifican la variante E2E6E7SH de VPH16 (SEQ ID NO: 3). De igual manera, se produjeron Ad26 y Ad35 que codifican la variante E6E7E2SH de VPH16 (SEQ ID NO: 5). También se produjo un vector Ad35 que codifica la proteína de fusión E2E6E7SH con una secuencia líder de IgE en el extremo N, denominado Ad35.VPH16-LSE2E6E7SH. También se produjo un adenovirus control con E6E7wt fusionado a la secuencia líder de IgE en el extremo N.

Los adenovirus recombinantes se produjeron en células PER.C6 y se purificaron mediante centrifugación en gradientes de cloruro de cesio.

Ejemplos adicionales de construcciones de la invención, que se acoplaron a sistemas represores, se proporcionan en un ejemplo posterior más adelante.

Ejemplo 2. Falta de actividad transformante de las construcciones diseñadoras

Las proteínas E6 y E7 de tipo salvaje de VPH16 tienen un potencial tumorigénico, que es evidente como actividad transformante en determinados ensayos tal como la formación de colonias en un ensayo de agar blando (Massimi y Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). El polipéptido E6E7SH, tal como se describe en el ejemplo 1, comprende los fragmentos de las proteínas E6 y E7 de una manera re-ordenada. Es de esperar que esto elimine el potencial tumorigénico tal como se puede medir, por ejemplo, por una actividad transformante significativamente reducida en comparación con cualquiera de las proteínas E6 y E7 wt en tales ensayos.

Otros informaron que variantes de E6 y E7 de VPH16 barajadas en genes han perdido, de hecho, su potencial oncogénico (Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Henken *et al.*, 2012, *Vaccine* 30: 4259-66), demostrando que el barajado de los genes destruye las funciones de tipo salvaje de las proteínas E6 y E7.

Para evaluar la pérdida de las propiedades tumorigénicas, los autores de la invención evaluaron la capacidad de que sus construcciones E6E7SH confirieran la capacidad de crecer en agar blando en células NIH 3T3 (tal como se describe, p. ej., por Massimi y Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). La transfección de células NIH3T3 con un plásmido que expresa E7 de tipo salvaje de VPH16 resultó de manera consistente en la formación de colonias. En estos ensayos, la expresión de E6 de tipo salvaje de VPH16 sola no provocó la formación de colonias por encima del fondo. Esto está en línea con las observaciones publicadas de que E7wt es mucho más eficaz que E6wt en este ensayo (Sedman *et al.*, 1991, *J Virol* 65: 4860-66). La transfección con la construcción E6E7SH de los autores de la invención no condujo al desarrollo de colonias de células en agar blando (Fig. 2) en cuatro experimentos independientes, demostrando que los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención, E6E7SH, han perdido la capacidad de transformación que está asociada con E7.

El potencial tumorigénico de E6 y E7 se asocia con su capacidad de reducir los niveles de las proteínas celulares p53 y pRb, respectivamente. Se realizaron ensayos de degradación de p53 y pRb para demostrar que el ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, E6E7SH, no tiene la actividad biológica asociada con las E6 y E7 de tipo salvaje al nivel molecular. En síntesis, E6wt de VPH16 y la construcción E6E7SH de los autores de la invención se expresaron en células NCI-H1299 que carecen de p53 endógena para el ensayo de degradación de p53. Para el ensayo de degradación de pRb, E6wt de VPH16 y la construcción E6E7SH se expresaron en células Saos-2 pRb nulas. Como puede verse en la Fig. 3, la co-expresión de p53 con E6wt, pero no con E6E7SH conduce a niveles reducidos de p53 (paneles A y B). De igual manera, los paneles 3C y 3D muestran que la expresión de pRb con E7wt, pero no con E6E7SH, conduce a niveles reducidos de pRb. Estos datos demuestran que el ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención no tiene la capacidad de formar colonias en agar blando y no contiene actividades biológicas principales de los polipéptidos E6 y E7 de tipo salvaje, a saber, la inactivación de p53 y pRb, respectivamente.

Para demostrar adicionalmente la seguridad de construcciones de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de la invención, los autores de la invención hicieron uso de queratinocitos de prepucio humano, que son las células diana naturales para la transformación mediada por el VPH. La inmortalización de queratinocitos humanos primarios requiere la acción tanto de E6 como de E7 de tipo salvaje (Munger *et al.*, 1989, *J Virol* 63: 4417-21). Este ensayo es probablemente el ensayo *in vitro* fisiológicamente más relevante para demostrar la seguridad de las construcciones de los autores de la invención (Massimi y Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Células transducidas con lentivirus que expresan E6 y E7 de tipo salvaje de VPH16 (E6E7wt) inducen la inmortalización en queratinocitos primarios tal como se indica por la extensión de su esperanza de vida en comparación con células control no transducidas (Fig. 4) y la activación de hTERT, la subunidad catalítica de telomerasa (datos no mostrados). La expresión del polipéptido de la invención (E6E7SH) no es capaz de prolongar la esperanza de vida en comparación con queratinocitos transducidos con GFP o no transducidos. Un resultado similar se obtuvo en dos donantes adicionales independientes (datos no mostrados). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que las construcciones de los autores de la invención han perdido la capacidad de inducir la inmortalización en queratinocitos humanos primarios, que se consideran un modelo altamente fisiológico.

Otra construcción, en donde fragmentos de E6 y E7 de VPH16 se recombinaron en otro orden, también fue incapaz

de immortalización de queratinocitos de prepucio humanos primarios. Sin embargo, para esa construcción se observó una esperanza de vida prolongada de hasta aproximadamente 120-150 días. Esto indica una cierta imprevisibilidad en este campo, y demuestra la superioridad de las moléculas diseñadoras de acuerdo con la invención en este aspecto relacionado con la seguridad.

- 5 En conjunto, los experimentos en este ejemplo proporcionan una fuerte evidencia de la carencia de actividad transformante de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de acuerdo con la invención y, por lo tanto, una seguridad fuertemente mejorada frente a construcciones de E6 y E7 wt de VPH16.

Ejemplo 3. Respuestas inmunológicas a las construcciones diseñadoras de E6E7SH

10 Los autores de la invención han preparado vectores de ADN y vectores adenovirales tal como se describe en el ejemplo 1.

Utilizaron la cepa de ratón CB6F1 para medir las respuestas inmunológicas, en base a experimentos iniciales en que los ratones fueron inmunizados con plásmidos de ADN que codifican E2 o E6 o E7 de tipo salvaje y la inmunización con antígenos E2, E6 y E7 de VPH16 indujo una respuesta inmune celular más amplia en CB6F1 que en ratones C57BL/6 o ratones BALB/c. En un experimento separado, los ratones fueron inmunizados con vectores de ADN que codifican moléculas de la invención y se midieron respuestas inmunológicas celulares. Respuestas inmunológicas específicas para E7 de VPH16 se podrían medir en ratones inmunizados con plásmidos de ADN que expresan E6E7SH (Fig. 5).

Los siguientes datos mostrados en este ejemplo son de experimentos con ratones que se llevaron a cabo con vectores adenovirales.

20 Para evaluar la inmunogenicidad inducida por la vacuna, ratones CB6F1 fueron inmunizados con adenovectores (Ad35) que expresan E6E7wt, LSE6E7wt, E6E7SH o adenovectores que no codifican un transgen (Vacíos). Dos dosis fueron testadas para la administración a los ratones: 5×10^9 partículas virales (vp) y 1×10^{10} vp. Dos y ocho semanas después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados y los esplenocitos aislados fueron estimulados durante una noche con una agrupación de péptidos 15meros de E7 de VPH16. Las respuestas específicas para E7 a las dos semanas y a las ocho semanas fueron analizadas mediante $IFN\gamma$ ELISPOT. Los datos se presentan en le Fig. 6.

Esto demuestra que la inmunización de ratones con Ad35.VPH16-E6E7SH induce respuestas inmunológicas específicas para E7 según se mide por análisis ELISPOT. Además, los resultados en la Fig. 6 demuestran la posibilidad de potenciar la respuesta inmunológica contra un transgen expresado de forma adenoviral al añadir una secuencia líder N-terminal al transgen.

30 Seguidamente se testó el efecto de añadir E2 al polipéptido E6E7SH con respecto a la inmunogenicidad. Los vectores Ad35 codificaban polipéptidos que tenían E2 fusionada al extremo N (E2E6E7SH) o al extremo C (E6E7E2SH). Ratones CB6F1 fueron inmunizados con una dosis de 1×10^{10} vp. La Fig. 7 (tinción con tetrámero de E7) y la Fig. 8 (Panel C, $IFN\gamma$ ELISPOT) muestran las respuestas inmunológicas contra E7 que para las construcciones diseñadoras incluyendo E2 tienden a ser más altas en comparación con la construcción sin E2, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas. La respuesta contra E2 era más alta para vectores adenovirales que codifican sólo E2 en comparación con la respuesta para los vectores adenovirales que tenían E2 fusionada al polipéptido diseñador E6E7SH (Fig. 8B), siendo las diferencias significativas tanto para E2 frente a E2E6E7SH como para E2 frente a E6E7E2SH (valor p: <0.05).

40 Se concluye que las construcciones diseñadoras que incluyen además E2 pueden seguir proporcionando una respuesta inmunológica contra E7 y, además, proporcionan también una respuesta inmunológica contra E2, aumentando así la amplitud de la respuesta inmunológica frente a las construcciones que no incluyen E2.

45 La adición de una secuencia líder demostró resultar en respuestas específicas para E7 mayores cuando se fusiona al extremo N de la proteína de fusión de E6 y E7 de tipo salvaje (Fig. 6C). De manera similar, se determinó el efecto de la secuencia líder sobre la inmunogenicidad de la proteína de fusión E2E6E7SH. Por lo tanto, vectores Ad35 que codifican el polipéptido diseñador, con o sin E2 N-terminal y un vector Ad35 que codifica LSE2E6E7SH se utilizaron para la inmunización de ratones y se tomaron muestras de sangre a intervalos de dos semanas para medir las respuestas inmunológicas específicas para E7 (Fig. 9). Tal como se muestra en las Figs. 7 y 8, la presencia de E2 fusionada en el extremo N o C a E6E7SH tendió a aumentar las respuestas inmunológicas. La adición de la secuencia líder de IgE aumentó adicionalmente la respuesta específica para E7 (Fig. 9B). A lo largo del tiempo se observaron respuestas inmunológicas sostenidas para los tres vectores adenovirales que codificaban moléculas diseñadoras de acuerdo con la invención, y la respuesta inmunológica más alta después de la inmunización correspondía a las respuestas más altas a lo largo de la duración del experimento.

55 Se concluye que las respuestas que son inducidas por la construcción diseñadora que incluye, además, E2 N-terminal se pueden incrementar mediante la adición de secuencias específicas, p. ej., la secuencia líder de IgE, que fijan como objetivo la proteína codificada a $co0$ mpartimientos celulares específicos.

La respuesta inmunológica celular contra el péptido de la invención puede ser inducida con diferentes tipos de vectores

adenovirales. En el experimento pr4eevio, los autores de la invención utilizaron vectores Ad35, mientras que en el experimento de la Fig. 10 los ratones fueron inmunizados con un vector adenoviral Ad26 que expresa E2E6E7SH. Los datos demuestran que también la inmunización con una vacuna basada en Ad26 inducía células T específicas para E7. Además, los resultados demuestran que una segunda inmunización con un vector adenoviral Ad35 que expresa E2E6E7SH reforzó adicionalmente las respuestas inmunológicas celulares (Fig. 10).

Ejemplo 4. Inmunogenicidad de construcciones diseñadoras en macacos rhesus.

Para evaluar la capacidad de los vectores adenovirales de expresar la secuencia diseñadora de la invención para inducir respuestas inmunológicas en primates no humanos, macacos rhesus fueron inmunizados mediante inyección intramuscular con adenovectores (Ad26) que expresan E2E6E7SH o adenovectores que no codifican un transgen (Vacíos) con una dosis de 1×10^{11} vp. Ocho semanas después de la inmunización, las respuestas inmunológicas fueron reforzadas mediante inmunización con vectores Ad26 que expresan el mismo antígeno. En la semana 16, los animales recibieron una inyección más con los vectores Ad35 que expresan el mismo antígeno. Se tomaron muestras de sangre en varios momentos y los glóbulos blancos aislados fueron estimulados durante la noche con una agrupación de péptidos correspondiente a E2, E6 o E7 de VPH16. Respuestas específicas se midieron mediante IFN γ ELISPOT. Los datos se presentan en le Fig. 11. Además, en la semana 10 y la semana 18 post-inmunización de sensibilización, se evaluó la respuesta inmunológica celular específica para péptidos que abarcan las nuevas uniones en la invención. La inducción de la respuesta IFN γ estaba en todos los animales por debajo del límite de detección de < 50 SFU por cada 1×10^6 PBMC (datos no mostrados).

Los datos demuestran que la inmunización de primates no humanos con Ad26.VPH16-E2E6E7SH resultó en respuestas inmunológicas celulares contra las tres proteínas de VPH16 que están presentes en el transgen codificado, pero no contra las nuevas uniones. Las respuestas se podían reforzar mediante la inmunización adicional con Ad26.VPH16-E2E6E7SH y el refuerzo adicional en la semana 16 con el correspondiente vector Ad35 aumentó adicionalmente las respuestas inmunológicas específicas para E2, E6 y E7 de VPH16.

Una administración de refuerzo tardía en la semana 72 con Ad26.VPH16-E2E6E7SH resultó de nuevo en un incremento de la respuesta inmunológica celular de VPH16, que disminuyó después de unas pocas semanas (no mostrado).

En un experimento separado (no mostrado), macacos Rhesus fueron inmunizados mediante administración intravaginal con una combinación de dos vectores adenovirales, uno que expresa E6E7SH de VPH16 y el otro la proteína L1 de VPH16. Se midieron respuestas celulares bajas pero mensurables en células de la sangre mononucleares periféricas tanto frente a E6 como a E7. En estos experimentos se detectaron fuertes respuestas inmunológicas celulares contra L1.

Ejemplo 5. Eficacia terapéutica en un modelo de tumor de ratón.

El polipéptido de la invención es capaz de inducir una respuesta inmunológica celular específica para VPH16 en animales, la cual puede ejercer un efecto terapéutico sobre células que expresan E6 y/o E7 de VPH16. La inmunización terapéutica, es decir la inmunización después de haberse iniciado el crecimiento del tumor, se puede utilizar para demostrar la eficacia de un candidato de vacuna terapéutica contra el VPH. El efecto terapéutico de los vectores Ad26 y Ad35 se testó en ratones a los que se inyectaron células TC-1 (células de ratón que expresan E6 y E7 de VPH16)(Lin *et al.*, 1996, *Cancer Res* 56: 21-6). Las células TC-1 formarán un tumor sólido en el espacio de unos pocos días a semanas después de la inyección subcutánea en ratones. Sin la vacuna, los tumores crecieron rápidamente y alcanzaron un tamaño predeterminado de 1000 mm³ en el espacio de 30 días (paneles D y E). Tras alcanzar este tamaño, los ratones fueron sacrificados por razones éticas.

Con un esquema de inmunización por sensibilización-refuerzo con SLPs (utilizados como un control positivo; Kenter *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 361:1838-47; Zwaveling *et al.*, 2002, *J Immunol* 169:350-8) o vectores adenovirales que expresan VPH16-E2E6E7SH se observó una disminución acusada del crecimiento de tumores inducidos por TC-1 (Fig. 12, paneles B y C). Una inspección más estrecha de los primeros 30 días después de las inmunizaciones de sensibilización (Paneles F y G) demuestra que la inmunización con los adenovectores que expresan E2E6E7SH tiene un impacto sustancialmente mayor sobre el crecimiento del tumor que la inmunización con los SLPs. La tasa de crecimiento inicial es más baja y en la mayoría de los casos los tumores se contraen. En 3 de los 11 ratones inmunizados con los vectores adenovirales, los tumores fueron erradicados por completo, lo cual se refleja en la gráfica de supervivencia (panel H).

En conclusión, la inmunización con vectores adenovirales que expresan un polipéptido de la invención redujo significativamente el crecimiento del tumor o erradicó por completo tumores establecidos en un modelo de enfrentamiento bien establecido para el cáncer inducido por VPH16.

Ejemplo 6: Empleo de sistema represores para mejorar la productividad y la estabilidad genética de vectores adenovirales que expresan antígenos derivados del HOV

Se ha reseñado previamente que transgenes insertados en vectores de adenovirus bajo el control de poderosos promotores constitutivamente activos, dependiendo de las propiedades del producto transgénico, puede impactar

negativamente sobre la producción del vector (Yoshida & Yamada, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 230:426-30; Rubinchik *et al.*, 2000, *Gene Ther* 7:875-85; Matthews *et al.*, 1999, *J Gen Virol* 80:345-53; Edholm *et al.*, 2001, *J Virol* 75:9579-84; Gall *et al.*, 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73). Ejemplos de aspectos de productividad de vectores dependientes de transgenes incluyen un rescate ineficaz del vector y crecimiento, bajos rendimientos finales de vector y, en casos graves, un rápido desarrollo de mutantes virales con casetes de transgenes defectuosas. Para resolver estos aspectos, múltiples estudios exploraron la posibilidad de silenciar la expresión transgénica de vectores durante la replicación del vector en células productoras (Matthews *et al.*, 1999, *J Gen Virol* 80:345-53; Edholm *et al.*, 2001, *J Virol* 75:9579-84; Gall *et al.*, 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73; Cottingham *et al.*, 2012, *Biotechnol Bioeng* 109:719-28; Gilbert *et al.*, 2014, *J Virol Methods* 208:177-88). A este respecto, se han implementado previamente diferentes sistemas de represión en el contexto de vectores Ad y, de hecho, mostraron mejorar la productividad del vector y la estabilidad genética para vectores que codifican diferentes tipos de transgenes (inhibidores).

Se ha observado que algunos de los vectores de adenovirus descritos en esta memoria, así como algunos otros vectores adenovirales que codifican determinadas variantes de antígenos del VPH exhibían algunos de los aspectos de productividad de vectores dependiente de transgenes arriba descritos y, por lo tanto, podrían posiblemente mejorarse adicionalmente a ese respecto. Los autores de la invención buscaron, por lo tanto, investigar si el uso de sistemas para reprimir la expresión transgénica del vector puede mejorar las características de producción de antígenos derivados de VPH que expresan vectores Ad como los descritos en esta memoria. Para este fin, los autores de la invención implementaron dos sistemas de represor-operador existentes, es decir, TetR/TetO (Yao & Eriksson, 1999, *Hum Gene Ther* 10:419-22, EP0990041B1) y CymR/CuO (Mullick *et al.*, 2006, *BMC Biotechnol* 6:43) en su plataforma de vector de adenovirus. Tanto el sistema TetR/TetO como el CymR/CuO se han utilizado previamente por parte de otros para mejorar la productividad del vector de adenovirus a través del silenciamiento del transgen del vector durante la replicación del vector (Gall *et al.*, 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73; Cottingham *et al.*, 2012, *Biotechnol Bioeng* 109:719-28; Gilbert *et al.*, 2014, *J Virol Methods* 208:177-88). La implementación de estos dos sistemas implicaba la generación de vectores adenovirales que expresan genes de interés bajo el control de un promotor de CMV que contiene una secuencia TetO o una secuencia CuO. Además de ello, la implementación incluía la generación de líneas celulares que expresan establemente las proteínas represoras afines respectivas (es decir, TetR o CymR).

Se generaron varios vectores suprimidos en E1 y basados en Ad26 y Ad35, en los que secuencias que codifican polipéptidos heterólogos fueron enlazadas operativamente a un promotor de CMV que contiene secuencias de operador TetO o CuO. Primero, determinadas secuencias que contienen TetO o CuO (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente) se insertaron cerca del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del promotor de CMV (SEQ ID NO: 13) de los plásmidos pAdapt26 y pAdapt35.Bsu (Abbink *et al.*, 2007, *J Virol* 81:4654-63; Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87:2135-43). Las secuencias con contenido en operador se insertaron precisamente en las mismas posiciones que del promotor de CMV que previamente se ha descrito para los dos sistemas (Yao & Eriksson, 1999, *Human Gene Ther* 10:419-22; EP0990041B1; Mullick *et al.*, 2006, *BMC Biotechnol* 6:43; EP1385946B1). Específicamente, con relación al TSS (como originalmente se asignó: Stenberg *et al.*, 1984, *J. Virol.* 49: 190-9), las secuencias que contienen TetO y CuO se insertaron directamente aguas abajo de las posiciones -20 y +7, respectivamente. En la SEQ ID NO: 13, estas dos posiciones corresponden a las posiciones 716 y 742, respectivamente. Los promotores de CMV con contenido en operador resultantes se denominan, respectivamente, CMVTetO y CMVCuO. Seguidamente, diferentes transgenes se insertaron aguas abajo de los promotores de CMV (modificados) de las construcciones resultantes, utilizando los sitios de restricción HindIII y XbaI. Estos transgenes incluían genes que codifican una proteína de fusión de proteína fluorescente verde y luciferasa (GFP-Luc), LSE2E6E7SH de la presente invención, y otro polipéptido con alguna similitud con LSE2E6E7SH (una construcción a la que se alude en este ejemplo como 'VPHAg'). VPHAg comprende la misma secuencia líder que la que está presente en LSE2E6E7SH, así como las secuencias de E2, E6 y E7 de VPH16. Utilizando métodos como los descritos en esta memoria, los plásmidos pAdapt26 y pAdapt35.Bsu modificados resultantes se utilizaron para la generación de vectores adenovirales que expresan los transgenes informador y de VPH arriba mencionados bajo el control del promotor de CMVTetO o de CMVCuO.

Líneas celulares que expresan TetR o CymR se generaron mediante transfección estable de células PER.C6@ utilizando, respectivamente, plásmido pcDNATM6/TR (LifeTechnologies, V1025-20) y un derivado de pcDNATM6/TR, en el que la secuencia codificante de TetR (SEQ ID NO: 14, que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 15) se reemplaza por una secuencia codificante de CymR optimizada en codones (SEQ ID NO: 16, que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 17). Una generación de líneas celulares estable se realizó ampliamente como se describe por el suministrador de pcDNATM6/TR, utilizando un ensayo basado en la transfección transitoria para rastrear clones de células capaces de reprimir la expresión de genes impulsados por CMVTetO o CMVCuO. Las líneas celulares PER.C6/TetR y PER.C6/CymR resultantes fueron analizadas en cuanto a su capacidad de reprimir la expresión transgénica durante la replicación del vector en estas células. Experimentos realizados con vectores que expresan GFP-Luc bajo el control de promotores de CMV con contenido en operador mostraron al menos una reducción décupla de la expresión del gen luciferasa a lo largo del ciclo completo de replicación del virus en líneas celulares que expresan el represor correspondiente a las secuencias de operador respectivas (datos no mostrados). Esto confirmó que las líneas celulares PER.C6/TetR y PER.C6/CymR eran capaces de reprimir la expresión transgénica del vector en el contexto de replicar vectores de adenovirus.

El efecto de la represión mediada por TetR y CymR la expresión transgénica del adenovector en los rendimientos de vectores se investigó para vectores basados en Ad35 que expresan VPHAg (Fig. 13A). Para este fin, líneas celulares

PER.C6, PER.C6/TetR y PER.C6/CymR, sembradas a razón de 3×10^5 células por pocillo en placas de 24 pocillos se sometieron a infecciones cuádruples - a 1000 partículas víricas por célula y durante un tiempo de tres horas - por parte de vectores que expresan VPHAg de promotores CMVTetO o CMVCuO. Como controles se realizaron infecciones paralelas con correspondientes vectores que expresan GFP-Luc en lugar de VPHAg. Cuatro días después de la infección, se prepararon lisados virales brutos sometiendo los contenidos de los pocillos (es decir, células infectadas y medio) a dos ciclos de congelación-descongelación. Los títulos de los adenovectores se determinaron subsiguientemente mediante un protocolo basado en la PCR cuantitativa específico para la secuencia del hexón de Ad35 que utiliza un vector Ad35 purificado con un título de partículas víricas conocido como patrón. Los resultados demuestran que los vectores Ad35 que codifican VPHAg con contenido tanto en TetO como en CuO, comparados con los vectores control que expresan GFP-Luc, exhiben rendimientos de vector disminuidos en células PER.C6 normales. En contraposición, cuando se producen en células que expresan sus represores afines (es decir, TetR y CymR, respectivamente), estos mismos vectores dieron rendimientos tan altos como los obtenidos con los vectores control. Estos datos indican que la represión de la expresión transgénica durante la producción del vector en células productoras puede ser beneficioso para la productividad de vectores Ad35 que portan VPHAg como un transgen.

El efecto que la represión de la expresión transgénica de adenovectores puede tener sobre los rendimientos de vectores se investigó también para vectores derivados de adenovirus serotipo 26 (Ad26) (Fig. 13B). En un ensayo realizado esencialmente como se describe arriba para los vectores Ad35, los vectores Ad26 que portan transgenes controlados en el promotor CMVTetO que codifican GFP-Luc, VPHAg o LSE2E6E7SH se utilizaron para infectar células PER.C6 y PER.C6/TetR a razón de 1500 partículas víricas por célula. Tres días más tarde, las infecciones se recolectaron y los títulos de partículas víricas se determinaron por un método basado en la PCR cuantitativa específico para la secuencia del hexón de Ad26. Los resultados demuestran que en células PER.C6 los rendimientos para los vectores que codifican VPHAg y LSE2E6E7SH eran más bajos que los obtenidos con el vector de control que codifica GFP-Luc. En contraposición, en células PER.C6/TetR, ambos de estos vectores mostraron títulos que eran tan altos como los obtenidos para el vector de control. Junto con los resultados de arriba (para los vectores Ad35) estos datos indican que la represión de la expresión transgénica durante la producción de adenovectores aumenta los rendimientos de vectores que expresan VPHAg y LSE2E6E7SH.

Los autores de la invención han observado aspectos principales en relación con la estabilidad genética de un vector de adenovirus que portaba un transgen para VPHAg impulsado por un promotor de CMV. Por ejemplo, se observó que después de varias rondas de paso de este vector por PER.C6, la mayoría de la población del vector consistía en un vector mutante que portaba una gran delección en la secuencia codificante de VPHAg (datos no mostrados).

Los autores de la invención razonaron que el empleo de un sistema de represión de la expresión transgénica, tal como uno de los dos arriba descritos, podría prevenir aspectos de estabilidad genética asociados con los transgenes tales como VPHAg, que son inhibidores del crecimiento del vector. Para someter esto a ensayo, un vector basado en Ad35 con expresión de VPHAg impulsada por el promotor CMVCuO se evaluó para la estabilidad de la casete transgénica tras el crecimiento del vector en células PER.C6 o PER.C6/CymR (Fig. 14). En síntesis, el ADN vector fue transfectado en las dos líneas celulares diferentes y se dejó que las placas virales resultantes crecieran bajo una capa de agarosa. De cada una de las dos tranfecciones se aislaron cinco placas virales y se hicieron pasar por separado adicionalmente sobre la misma línea celular (es decir, tal como se utiliza para la tranfección) durante los diez pasos virales consecutivos. La integridad del transgen se evaluó mediante amplificación por PCR de la casete de transgenes en el paso viral número diez (VPN10) y el subsiguiente análisis de los productos de la PCR resultantes mediante electroforesis en gel y secuenciación de Sanger. Además, en VPN7, los clones virales que pasaron se evaluaron en cuanto a su capacidad de expresar VPHAg. Esto se hizo utilizando los aislados virales que pasaron para infectar células A549 a razón de 1000 partículas víricas por célula, lisando las células a las 48 horas post-infección y analizando posteriormente la expresión de VPHAg mediante transferencia western utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra E7 de VPH16 (Santa-Cruz Biotechnology). Los resultados de la electroforesis en gel y los análisis de secuenciación demostraron que los cinco aislados virales que había pasado por células PER.C6 portaba cada uno pequeñas delecciones de desplazamiento de marco o mutaciones de parada prematura dentro de la casete del transgen. En contraposición, estas delecciones o mutaciones no podían detectarse en ninguno de los aislados de vectores que habían pasado por la línea celular que expresa CymR (PER.C6/CymR). De acuerdo con estos datos, todos los aislados de vector propagados por PER.C6/CymR eran capaces de expresar VPHAg, mientras que los vectores crecidos en PER.C6 perdieron por completo esta habilidad, sugiriendo cassetes de transgenes defectuosas para estos vectores. En conclusión, los datos de los autores de la invención demuestran que el empleo de un sistema represor tal como, por ejemplo, el sistema CymR/CuO, reprime la expresión del transgen del vector durante la propagación del vector es un medio eficaz para prevenir una inestabilidad grave de la casete del transgen tal como la que se observa para vectores que portan un VPHAg que expresa transgenes.

Bibliografía

Abbink P, Lemckert AA, Ewald BA, Lynch DM, Denholtz M, Smits S, Holterman L, Damen I, Vogels R, Thorner AR, O'Brien KL, Carville A, Mansfield KG, Goudsmit J, Havenga MJ, Barouch DH (2007) Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol* 81:4654-4663

Ausubel FM (1995) Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Wiley, [Chichester]

- Cottingham MG, Carroll F, Morris SJ, Turner AV, Vaughan AM, Kapulu MC, Colloca S, Siani L, Gilbert SC, Hill AV (2012) Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors. *Biotechnol Bioeng* 109:719-728
- 5 Daayana S, Elkord E, Winters U, Pawlita M, Roden R, Stern PL, Kitchener HC (2010) Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 102:1129-1136
- de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, van Meijgaarden KE, Drijfhout JW, Kenter G, Vermeij P, Melief CJ, Offringa R (2002) Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 62:472-479
- 10 Edholm D, Molin M, Bajak E, Akusjarvi G (2001) Adenovirus vector designed for expression of toxic proteins. *J Virol* 75:9579-9584
- Evans RK, Nawrocki DK, Isopi LA, Williams DM, Casimiro DR, Chin S, Chen M, Zhu DM, Shiver JW, Volkin DB (2004) Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines. *J Pharm Sci* 93:2458-2475
- Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9:1909-1917
- 15 Frøkjær S, Hovgaard L (2000) *Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins*. Taylor & Francis, London
- Gall JG, Lizonova A, EddyReddy D, McVey D, Zuber M, Kovessi I, Aughtman B, King CR, Brough DE (2007) Rescue and production of vaccine and therapeutic adenovirus vectors expressing inhibitory transgenes. *Mol Biotechnol* 35:263-273
- 20 Gao GP, Engdahl RK, Wilson JM (2000) A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther* 11:213-219
- Gennaro AR (1990) *Remington's pharmaceutical sciences*. Mack
- Gilbert R, Guilbault C, Gagnon D, Bernier A, Bourget L, Elahi SM, Kamen A, Massie B (2014) Establishment and validation of new complementing cells for production of E1-deleted adenovirus vectors in serum-free suspension culture. *J Virol Methods* 208:177-188
- 25 Hamid O, Carvajal RD (2013) Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 13:847-861
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- 30 Havenga M, Vogels R, Zuidgeest D, Radosevic K, Mueller S, Sieuwerts M, Weichold F, Damen I, Kaspers J, Lemckert A, van Meerendonk M, van der Vlugt R, Holterman L, Hone D, Skeiky Y, Mintardjo R, Gillissen G, Barouch D, Sadoff J, Goudsmit J (2006) Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells. *J Gen Virol* 87:2135-2143
- Henken FE, Oosterhuis K, Ohlschlager P, Bosch L, Hooijberg E, Haanen JB, Steenbergen RD (2012) Preclinical safety evaluation of DNA vaccines encoding modified HPV16 E6 and E7. *Vaccine* 30:4259-4266
- 35 Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, Schiller JT, Gonzalez P, Dubin G, Porras C, Jimenez SE, Lowy DR (2007) Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298:743-753
- Hoganson DK, Ma JC, Asato L, Ong M, Printz MA, Huyghe BG, Sosnowski BA, D'Andrea MJ (2002) Development of a stable adenoviral vector formulation. *Bioprocess J* 1:43-48
- 40 Hoof I, Peters B, Sidney J, Pedersen LE, Sette A, Lund O, Buus S, Nielsen M (2009) NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics* 61:1-13
- Horwitz MS (1996) *Adenoviruses*. En: Fields BN, Knipe DM, Baines JD (comps) *Virology*. Raven Press Ltd, New York
- 45 Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, Essahsah F, Fathers LM, Offringa R, Drijfhout JW, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, van der Burg SH, Melief CJ (2009) Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361:1838-1847
- Kibbe AH (2000) *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press, London
- Kovessi I, Hedley SJ (2010) Adenoviral producer cells. *Viruses* 2:1681-1703
- 50 Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 56:21-26
- Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res* 36:W509-512
- 55 Massimi P, Banks L (2005) Transformation Assays for HPV Oncoproteins. En: Davy C, Doorbar J (comps) *Human Papillomaviruses : Methods and Protocols*. Vol 119: *Methods in Molecular Medicine* Springer, Berlin, pp 381-395
- Matthews DA, Cummings D, Eveleigh C, Graham FL, Prevec L (1999) Development and use of a 293 cell line expressing lac repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):345-353
- 60 McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (1995) *PCR 2 : a practical approach*. IRL Press en Oxford University Press, Oxford
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-489
- Mullick A, Xu Y, Warren R, Koutroumanis M, Guilbault C, Broussau S, Malenfant F, Bourget L, Lamoureux L, Lo R, Caron AW, Pilote A, Massie B (2006) The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol* 6:43
- 65 Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus

type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63:4417-4421

Ogun SA, Dumon-Seignovert L, Marchand JB, Holder AA, Hill F (2008) The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria. *Infect Immun* 76:3817-3823

5 Oosterhuis K, Aleyd E, Vrijland K, Schumacher TN, Haanen JB (2012a) Rational Design of DNA Vaccines for the Induction of Human Papillomavirus Type 16 E6- and E7-Specific Cytotoxic T-Cell Responses. *Hum Gene Ther* 23:1301-1312

Oosterhuis K, Ohlschlager P, van den Berg JH, Toebes M, Gomez R, Schumacher TN, Haanen JB (2011) Preclinical development of highly effective and safe DNA vaccines directed against HPV 16 E6 and E7. *Int J Cancer* 129:397-406

10 Oosterhuis K, van den Berg JH, Schumacher TN, Haanen JB (2012b) DNA vaccines and intradermal vaccination by DNA tattooing. *Curr Top Microbiol Immunol* 351:221-250

Peters B, Tong W, Sidney J, Sette A, Weng Z (2003) Examining the independent binding assumption for binding of peptide epitopes to MHC-I molecules. *Bioinformatics* 19:1765-1772

15 Prakash SS, Grossman SR, Pepinsky RB, Laimins LA, Androphy EJ (1992) Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2 trans-activator. *Genes Dev* 6:105-116

Rubinichik S, Ding R, Qiu AJ, Zhang F, Dong J (2000) Adenoviral vector which delivers FasL-GFP fusion protein regulated by the tet-inducible expression system. *Gene Ther* 7:875-885

Sambrook JFEFMT (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

20 Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT (1991) The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 65:4860-4866

Shenk T (1996) *Adenoviridae and their Replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Baines JD (comps) *Virology*. Raven Press Ltd, New York

25 Smahel M, Sima P, Ludvikova V, Vonka V (2001) Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology* 281:231-238

van der Burg SH, Melief CJ (2011) Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr Opin Immunol* 23:252-257

Watson JD (1992) *Recombinant DNA*. Scientific American Books, New York

30 Wieking BG, Vermeer DW, Spanos WC, Lee KM, Vermeer P, Lee WT, Xu Y, Gabitzsch ES, Balcitis S, Balint JP, Jr., Jones FR, Lee JH (2012) A non-oncogenic HPV 16 E6/E7 vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors. *Cancer Gene Ther* 19:667-674

Yan J, Reichenbach DK, Corbitt N, Hokey DA, Ramanathan MP, McKinney KA, Weiner DB, Sewell D (2009) Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel HPV-16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen. *Vaccine* 27:431-440

35 Yao F, Eriksson E (1999) A novel tetracycline-inducible viral replication switch. *Hum Gene Ther* 10:419-427

Yoshida Y, Hamada H (1997) Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 230:426-430

40 Yugawa T, Kiyono T (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 19:97-113

Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ (2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169:350-358

Tabla I. secuencias

45 SEQ ID NO: 1 (VPH16-E6E7SH, secuencia de aminoácidos del polipéptido diseñador E6/E7 de VPH16)
 MHQKRTAMFQ DPQERPRKLP QLCTELQTTI HDIILECVYC KQQLEDEIDG PAGQAEPDRA HYNIVTFCKK
 CDSTLRRLCVQ STHVDIRTLE DLLMGTGLIV CPICSQKPGT TLEQQYNKPL CDLLIRCINC QKPLCPPEEKQ
 RHLDDKKQRFH NIRGRWTGRC MSCCRSSRTR RETQMHGDTPLTHEYMLDLQ PETTDLYCYE QLNDSSSEED
 50 EIDGPAGQAE PDRAHYNIVT FCCQLCTELQ TTIHDIILEC VYCKQQLLR EVYDFAFRDL CIVYRDGNPY
 AVCDKCLKFY SKISEYRHYC YSLYGTTLQ QYNKPLCDLL IRCINCQK

SEQ ID NO: 2 (VPH16-E6E7SH, secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia aminoácidos del polipéptido diseñador E6/E7 de VPH16)
 ATGCACCAGA AACGGACCGC CATGTTCCAG GACCCCCAGG AACGGCCCAG AAAGCTGCC CAGCTGTGCA
 CCGAGCTGCA GACCACCATC CACGACATCA TCCTGGAATG CGTGTACTGC AAGCAGCAGC TGAAGATGA
 55 GATCGACGGC CCTGCTGGCC AGGCCGAACC CGACAGAGCC CACTACAATA TCGTGACCTT CTGCTGCAAG
 TGCGACAGCA CCCTGCGGCT GTGCGTGCAG AGCACCCACG TGGACATCCG GACCCTGGAA GATCTGCTGA
 TGGGCACCCT GGGCATCGTG TGCCCCATCT GCAGCCAGAA GCCCGGCACC ACCCTGGAAC AGCAGTACAA
 CAAGCCCCTG TGCGACCTGC TGATCCGGTG CATCAACTGC CAGAAACCC TGTGCCCCGA GGAAGAGCAG
 CGGCACCTGG ACAAGAAGCA GCGGTTCCAC AACATCCGGG GCAGATGGAC AGGCAGATGC ATGAGCTGCT
 60 GCAGAAGCAG CCGGACCAGA CGGGAAACCC AGATGCACGG CGACACCCCC ACCCTGCACG AGTACATGCT
 GGACCTGCAG CCGGAGACAA CCGACCTGTA CTGCTACGAG CAGCTGAACG ACAGCAGCGA GGAAGAGGAC
 GAGATTGACG GACCCGCTGG ACAGGCCGAG CCTGACCGGG CTCACTATAA CATCGTGACA TTTTGCTGTC
 AGCTCTGTAC TGAACCTCAG ACAACAATTC ACGATATTAT TCTCGAATGT GTGTATTGTA AACAGCAGCT
 CCTGCGGAGA GAGGTGTACG ACTTCGCCTT CCGGGACCTC TGCATCGTGT ATCGGGACGG CAACCCCTAC

GCCGTGTGCG ACAAGTGCCT GAAGTTCTAC AGCAAGATCA GCGAGTACCG GCACTACTGC TACAGCCTGT
ACGGAACAAC ACTCGAACAG CAGTATAACA AACCCTCTG TGATCTGCTG ATTCGCTGTA TCAATTGTCA
GAAGTGATAA

SEQ ID NO: 3 (VPH16 E2E6E7SH, secuencia de aminoácidos del polipéptido diseñador E2/E6/E7 de VPH16)

5 METLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREMGFKHINHQVVP TLAVSKNKALQAIELQLTL
ETIYNSQYSNEKWTLDVSLVYL TAPTGCIKKHGYTVEVQFDGDCINTMHYTNWTHIYICEEASVTVVEGQVDYYGL
YYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNKVWEVHAGGQVILCPTSVFSSNEVSSPEIIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQ
TTIQRPRSEPD TGNPCHTTKLLHRDSVDSAPIL TAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYRFFKKHCTLYTA
VSSTWHWTGHNVKHKSIAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTIIVSTGFMSIMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTEL
10 QTTIHDIIILECVYCKQQLLEIDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKDSTLR LCVQSTHVDIR TLEDLLMGLGIVCPICSQ
KPGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPPEEKQRHL DKKQRFHNI RGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQMHGDTPTL
HEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRE
VYDFAFRDL CIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQK

SEQ ID NO: 4 (VPH16 E2E6E7SH, secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido diseñador E2/E6/E7 de VPH16)

15 ATGGA AACCCGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCAGGACAAGATCCTGACCCACTACGAGAACGACAGCACCG
ACCTGCGGGACCACATCGACTACTGGAAGCACATGCGGCTGGAATGCGCCATCTACTACAAGGCCAGAGAGAT
GGGCTTCAAGCACATCAACCACCAGGTGGTGGCCACCCTGGCCGTGTCCAAGAACAAGGCCCTGCAGGCCATC
GAGCTGCAGCTGACCCTGGAACCATCTACAACAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCCTGCAGGACGTGT
CCCTGGAAGTGTACCTGACCGCTCCACCGGCTGCATCAAGAAACACGGCTACACCGTGAAGTGCAGTTCGA
20 CGGCGACATCTGCAACACCATGCACTACACCACTGACCCACATCATATCTGCAAGAGGCCAGCGTGACC
GTGGTGAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGTACTGCACGAGGGCATCCGGACCTACTCTCGTGACGT
TCAAGGACGACGCGGAGAAAGTACAGCAAGAACAAGAGTGTGGGAGGTGCACGCTGGCGGCCAGGTTCATCTGTG
CCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAACGAGGTGTCCAGCCCCGAGATCATCCGGCAGCACCTGGCCAATCACCCCT
GCCGCCACCCACACAAAGGCCGTGGCCCTGGGCACCGAGGAAACCCAGACCACCATCCAGCGGCCAGAAAGC
25 GAGCCCGACACCGCAATCCCTGCCACACCACCAAGCTGCTGCACCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCCTATC
CTGACCGCCTTCAACAGCAGCCACAAGGGCCGGATCAACTGCAACAGCAACACCACCCCATCGTGCACCTGA
AGTGGACGCCAACACCTGATGCGGCTGCGGTACAGATTCAAGAAGCACTGCACCCTGTACACCGCCGTGTC
CTCCACCTGGCACTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACAAGAGCGCCATCGTACCCTGACCTACGACAGCGAG
TGGCAGCGGGACCAGTTCTGAGCCAGGTCAAAATCCCCAAGACCATCACCGTGTCCACCGGCTTCATGAGCA
30 TCATGCACCAGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGCCAGAAAGCTGCCCCAGCTGTGCAC
CGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCTGGAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAGCTGGAAGATGAGATC
GACGGCCCTGCTGGCCAGGCCGAACCCGACAGAGCCCACTACAATATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGCAGCA
GCACCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGTGGACATCCGGACCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCCT
GGGCATCGTGTGCCCCATCTGCAGCCAGAAGCCCGGCACCCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGC
35 GACCTGCTGATCCGGTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGA
AGCAGCGTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACAGGAGATGCATGAGCTGCTGCAGAGCAGCGCGGACCA
GACGGGAAACCCAGATGCACGGCGACACCCCAACCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCCGAGACAA
CCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAGGAAGAGGACGAGATTGACGGACCCGCTGGAC
AGGCCGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATTTTGTGTGCTGCTGACTGAACTCCAGACAACA
40 ATTCACGATATTATTCTCGAATGTGTGATTGTAAACAGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTC
CGGGACCTCTGCATCGTGTATCGGGACGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCA
AGATCAGCGAGTACCGGCAC TACTGCTACAGCCTGTACGGAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTC
TGATCTGCTGATTCTGCTGTATCAATTGTCCAGAAGTGATAA

SEQ ID NO: 5 (VPH16 E6E7E2SH, secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido diseñador E6/E7/E2 de VPH16)

45 MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLEIDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKDSTLR LRC
VQSTHVDIR TLEDLLMGLGIVCPICSQKPGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPPEEKQRHL DKKQRFHNI RGRWT
GRCMSSCRSSRTRRETQMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCC
50 QLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRE VYDFAFRDL CIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQY
NKPLCDLLIRCINCQKMETLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREMGFKHINHQVVP TLAV
VSKNKALQAIELQLTLETIYNSQYSNEKWTLDVSLVYL TAPTGCIKKHGYTVEVQFDGDCINTMHYTNWTHIYICEE
ASVTVVEGQVDYYGLYYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNKVWEVHAGGQVILCPTSVFSSNEVSSPEIIRQHLANHPA
ATHTKAVALGTEETQTTIQRPRSEPD TGNPCHTTKLLHRDSVDSAPIL TAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLM
RLRYRFFKKHCTLYTAVSSTWHWTGHNVKHKSIAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTIIVSTGFMSI

SEQ ID NO: 6 (VPH16 E6E7E2SH, secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido diseñador E6/E7/E2 de VPH16)

55 ATGCACGAAACCGACCGCCATGTTCCAGGACCCCGAACGGCCAGAAAGCTGCCCAAGCTGTGCACCG
AGCTCAGACACCATCCACGACATCATCTGGAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAGCTGGAAGATGAGATCAGC
GGCCCTGCTGGCCAGGCCGAACCCGACAGCCCACTACAATATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGCAGACAGCA
60 CCCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGTGGACATCCGGACCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCCTGG
GCATCGTGTGCCCATCTGCAGCCAGAAGCCCGGCACCCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGA
CCTGCTGATCCGGTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGAAG
CAGCGGTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACAGGAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAGCCGGACCAGA
CGGGAACCCAGATGCACGGCGACACCCCAACCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCCGAGACAAC
GACCTGTACTGCTACGACAGCTGAACGACAGCAGCAGGAGGACGAGATTGACGGACCCGCTGGACAG
65 GCCGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATTTTGTGTGCTGCTGACTGAACTCCAGACAACAATT
CACGATATTATTCTCGAATGTGTGATTGTAAACAGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCG

GGACCTCTGCATCGTGTATCGGGACGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAA
 ATCAGCGAGTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGTACGGAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTCTG
 TGATCTGCTGATTTCGCTGTATCAATTGTCAGAAGATGGAAACCCTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCAGGACA
 AGATCCTGACCCACTACGAGAACGACAGCACCCGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGGAAGCAGATGCGGGCT
 5 GGAATGCGCCATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGGCTTCAAGCACATCAACCACCAGGTGGTGCCACCCTG
 GCCGTGTCCAAGAACAAGGCCCTGCAGGCCATCGAGCTGCAGCTGACCCCTGGAACCCTTACAACAGCCAGT
 ACAGCAACGAGAAGTGGACCCCTGCAGGACGTGTCCCTGGAAGTGTACCTGACCCGCTCCACCCGGCTGCATCAA
 GAAACACGGCTACACCGTGAAGTGCAGTTCGACGGCGACATCTGCAACACCATGCACTACACCAACTGGACC
 CACATCTACATCTGCGAAGAGGCCAGCGTGACCGTGGTGAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGTACTACG
 10 TGCACGAGGGCATCCGGACCTACTTCGTGCAGTTCGACGGACGCGGAGAAGTACAGCAAGAACAAGTGTG
 GGAGGTGCACGCTGGCGGCCAGGTCAATCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAACGAGGTGTCCAGCCC
 CGAGATCATCCGGCAGCACCTGGCCAATCACCTGCCCGCCACCCACACAAAGGCCGTGGCCCTGGGCACCGA
 GGAAACCCAGACCACCATCCAGCGGCCAGAGCCGACCCGACACCCGGCAATCCCTGCCACACCACCAAGCT
 GCTGCACCGGACCGTGGACAGCGCCCTATCCTGACCGCTTCAACAGCAGCCACCCGCAATCCCTGCCACACCACCAAGCT
 15 CTGCAACAGCAACACCACCCCATCGTGACCTGAAGGTGGACGCCAACACCCCTGATGCGGCTGCGGTACAGA
 TTCAAGAAGCACTGCACCCTGTACACCGCCGTGTCTCCACCTGGCACTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACA
 AGAGCGCCATCGTGACCCTGACCTACGACAGCGAGTGGCAGCGGGACCAGTTCCTGAGCCAGGTCAAAATCCC
 CAAGACCATCACCGTGTCCACCGGCTTCATGAGCATCTGATAA
SEQ ID NO: 7 (secuencia de aminoácidos del péptido conductor de IgE)
 20 MDWTWILFLVAAATRVHS
SEQ ID NO: 8 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido conductor de IgE)
 ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGTGGTGGCTGCCGCAACCCGGGTGCACAGC
SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos del péptido conductor aa HAVT20)
 MACPGFLWALVISTCLEFSMA
 25 SEQ ID NO: 10 (secuencia de nucleótidos que codifica el péptido conductor HAVT20)
 ATGGCCTGCCCGGCTTTCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAATTCAGCATGGCC
SEQ ID NO: 11 (secuencia que contiene 2xTetO)
 GAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTTCGAC
SEQ ID NO: 12 (secuencia que contiene CuO)
 30 AACAACAGACAATCTGGTCTGTTTGT
SEQ ID NO: 13 (promotor de CMV presente en plásmidos pAdApt26 y pAdApt35)
 TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGT
 TGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACT
 AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGG
 35 TAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGCTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAA
 GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA
 CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTT
 TGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAA
 40 TGGGAGTTTGTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAAT
 GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAAACCGTCAGATCGCCTGGAGA
 CGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGA
 TTGGA
SEQ ID NO: 14 (TetR, secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido TetR
 expresado por pcDNATM6/TR)
 45 ATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTGCGGAATCGAAGGTTTA
 ACAACCCGTAAACTCGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGATTGGCATGTAAAAATAAGCGGGC
 TTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCTTTAGAAAGGGGAAAGCTG
 GCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAGTACAT
 50 TTAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTGAAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTT
 CACTAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGC
 ATCAAGTTCGTAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAAT
 TATTTGATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTATTTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAAC
 TAAATGTGAAAGTGGTCCGCGTACAGCGGATCCCGGGAATTCAGATCTTATTA
 55 SEQ ID NO: 15 (TetR, secuencia de aminoácidos del polipéptido TetR expresado por pcDNATM6/TR)
 MSRLDKSKVINSALLELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLDHRHHTFCPLEGESWQDF
 LRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSVAUGHFTLGCVLEDQEHQVAK
 EERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLIICGLEKQLKCESGSAYSRSREFRSY
SEQ ID NO: 16 (CymR, secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido CymR)
 60 ATGTCTCCCAAACGACGGACTCAAGCGGAAAGGGCAATGAAACTCAGGGTAAGCTGATTGCCGCGGCTCTGG
 GAGTGTGCGAGAGAAAGGTATGCCGGTTTTCGCATAGCCGACGTTCTGGAGCTGCAGGCGTAAGCAGAG
 GAGCCCAATCTCATCACTTTCCGACCAAGCTGGAGCTTTTGTGGCTACCTTCGAATGGCTGTACGAGCAGATC
 ACGGAAAGGAGTCTGTAGCTAGGCTGGCCACAGCTGAAACCCGAGGATGATGTCATTACGAGATGCTGGACGATG
 CAGCCGAGTTCTTCTGCTGACGACGACTTCAGCATCAGTCTCGACCTCATCGTAGCCGAGATGCGCATCCAGCT
 65 TTGCGCGAGGGCATAAGAGAACAGTTCGAGCGGAATCGGTTTGTGGTGGAGGACATGTGGCTTGGTGTCTGG
 TGAGCAGAGGCCTCTCACGGGATGATGCCGAGGACATCCTGTGGCTGATCTTAACTCCGTCAGAGGGTTGGC

ES 2 697 903 T3

AGTGAGGTCCCTTTGGCAGAAGGACAAAGAACGGTTTGAACGTGTGCGAAACTCAAACTCGAGATTGCTAGGG
AACGCTACGCCAAGTTCAAGAGATGA

SEQ ID NO: 17 (CymR, secuencia de aminoácidos del polipéptido CymR)

5 MSPKRRTQAERAMETQGKLIAAALGVLREKGYAGFRIADVPGAAGVSRGAQSHHFPTKLELLLATFEWLYEQITERSR
ARLAKLKPEDDVIQQMLDDAAEFFLDDDFSISLDLIVAADRDPALREGIQRTVERNRFVVEDMWLGVLVSRGLSRDDA
EDILWLIFNSVRGLAVRSLWQDKERFERVRNSTLEIARERYAKFKR

SEQ ID NO: 18 (VPH16 E6, aa41-65)

KQQLLRREYDFAFRDLCIVYRDGN

SEQ ID NO: 19 (VPH16 E7 aa 43-77) GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1.
2. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido codificado comprende, además, una secuencia líder.
- 5 3. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido codificado comprende, además, al menos un epítipo de una proteína E2 del virus del papiloma humano (VPH).
4. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el polipéptido codificado comprende la proteína E2 de VPH16 que tiene una delección o mutación en su dominio de unión al ADN.
- 10 5. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polipéptido codificado comprende la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.
6. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia de ácidos nucleicos está optimizada en codones.
- 15 7. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la SEQ ID NO: 2.
8. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde una secuencia que codifica el polipéptido está operativamente enlazada a un promotor.
9. Un vector de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el vector es un adenovirus recombinante.
10. Un vector de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el vector es un vector Vacuna Ankara Modificada (MVA).
- 20 11. Un vector de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde el promotor está operativamente acoplado a una secuencia de operador represor a la que una proteína represora se puede unir con el fin de reprimir la expresión del promotor en presencia de dicha proteína represora.
12. Una composición de vacuna que comprende un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 13. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en inducir una respuesta inmunológica contra VPH en un sujeto.
14. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 se administra al sujeto más de una vez.
- 30 15. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en una vacunación de sensibilización-refuerzo para inducir una respuesta inmunológica contra VPH en un sujeto, en donde en una vacuna de sensibilización el vector es un vector adenoviral y en la vacuna de refuerzo el vector es un vector MVA, o viceversa.
- 35 16. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de una infección persistente por VPH, neoplasia intraepitelial vulvar (VIN), neoplasia intraepitelial cervical (CIN), neoplasia intraepitelial vaginal (VaIN), neoplasia intraepitelial anal (AIN), cáncer cervical (tal como carcinoma cervical de células escamosas (SCC), cáncer orofaríngeo, cáncer del pene, cáncer vaginal o cáncer anal en un sujeto.
17. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el uso es en el tratamiento de una infección persistente por VPH.
18. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el uso es en el tratamiento de CIN.
- 40 19. Un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1.
20. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

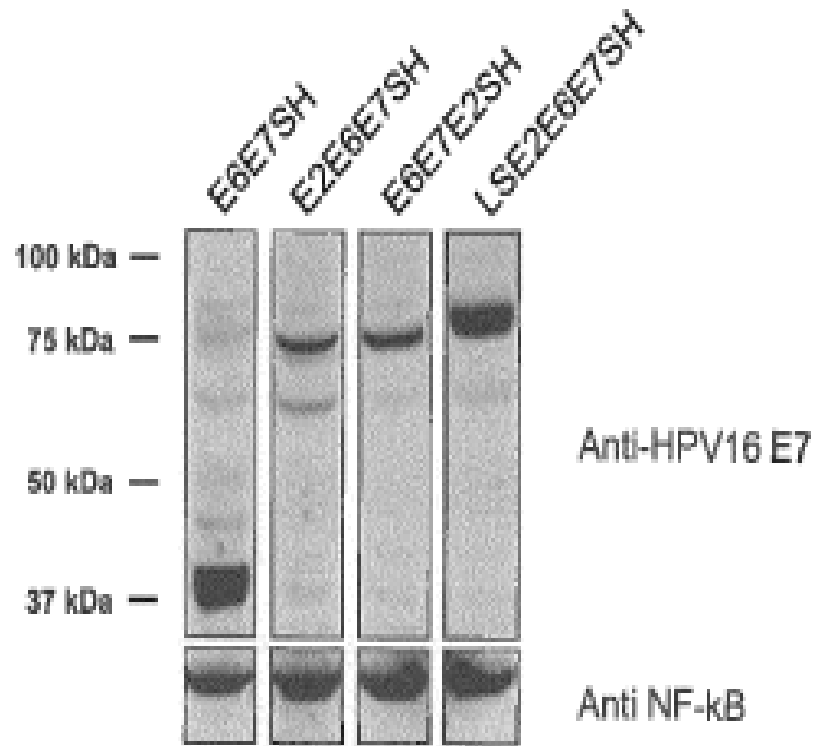


Fig. 1

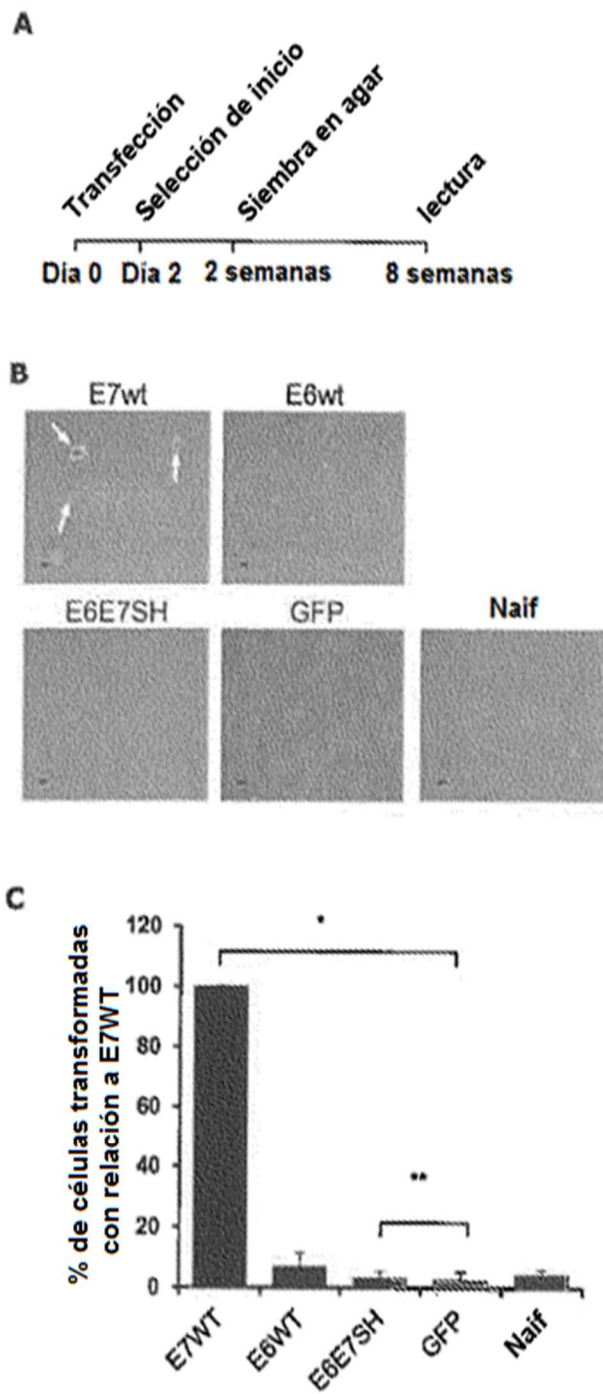


Fig. 2

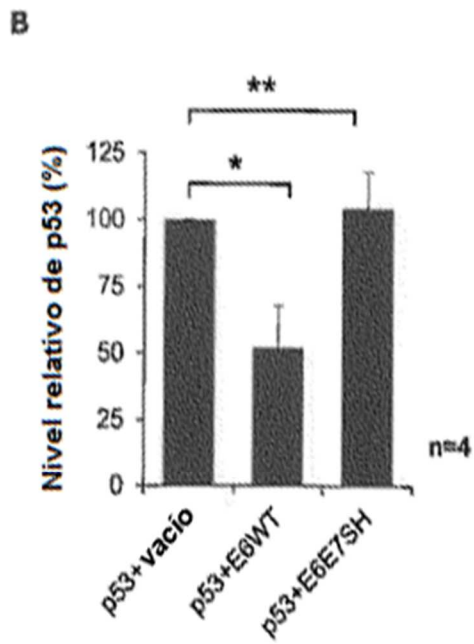
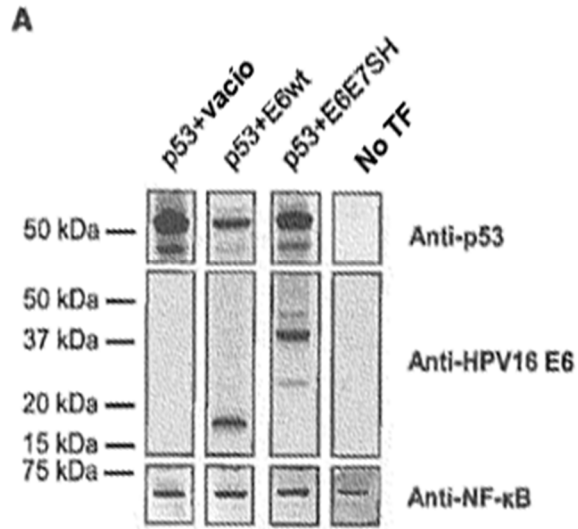


Fig. 3

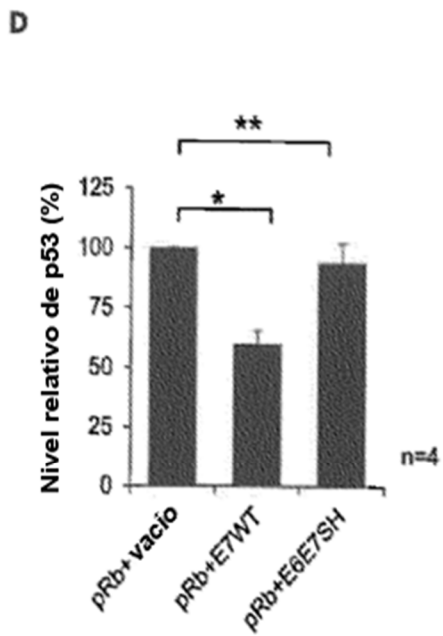
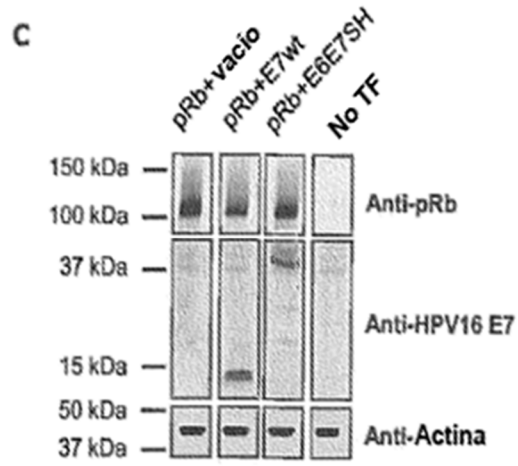


Fig. 3 - continuación

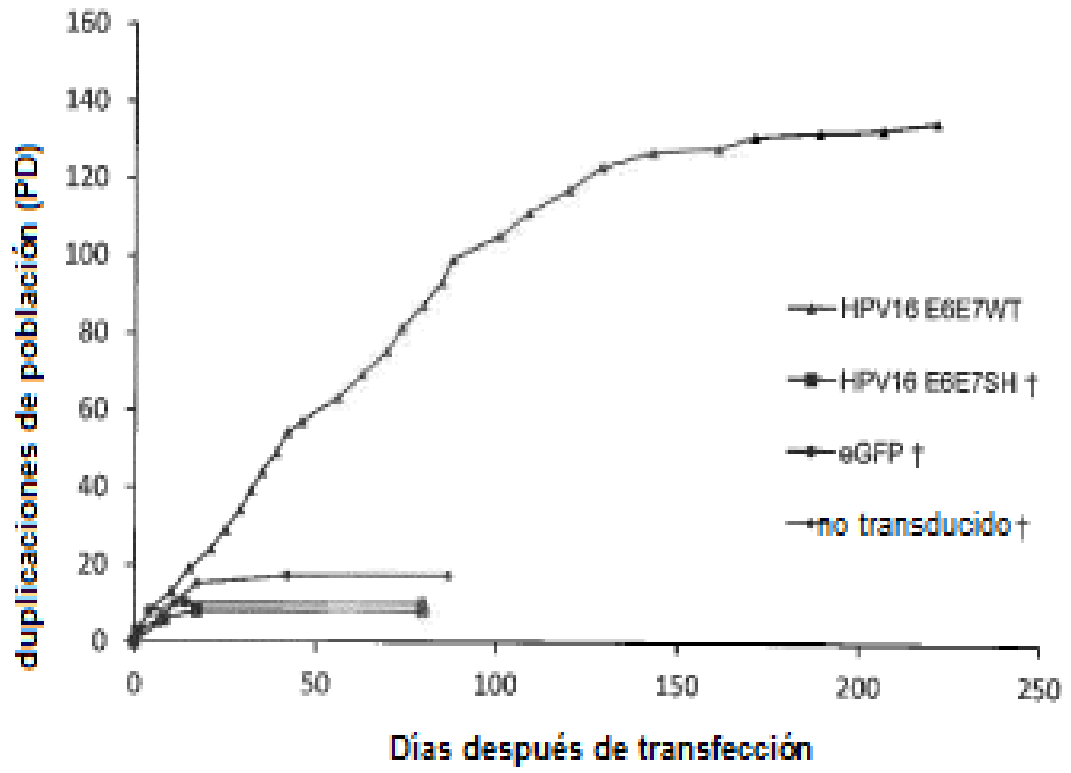


Fig. 4

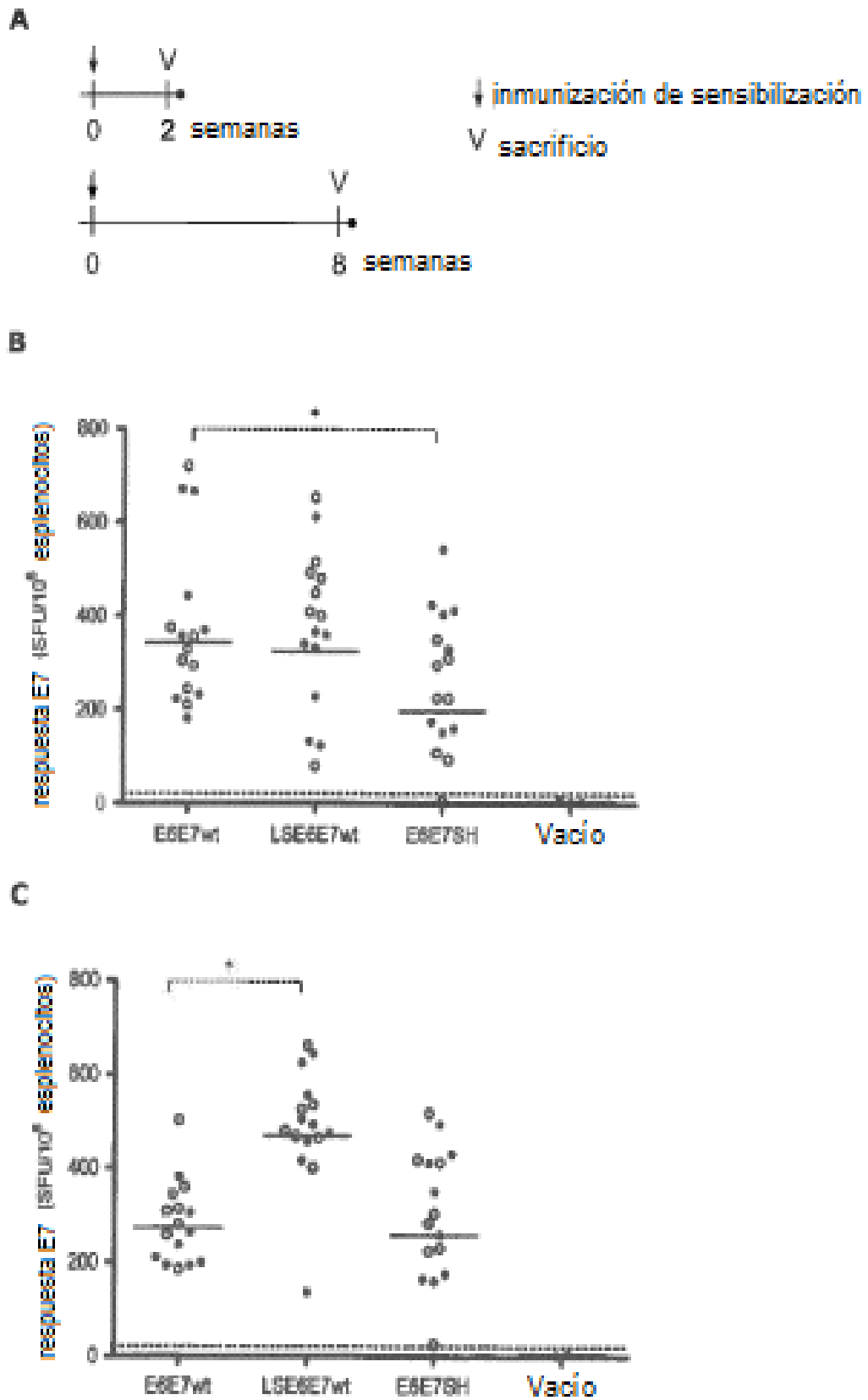


Fig. 6

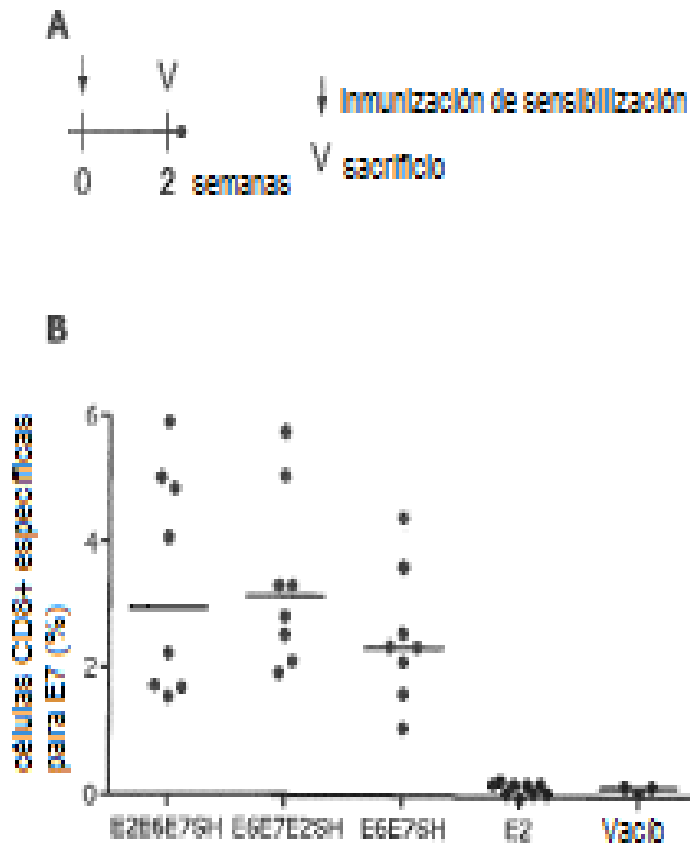


Fig . 7

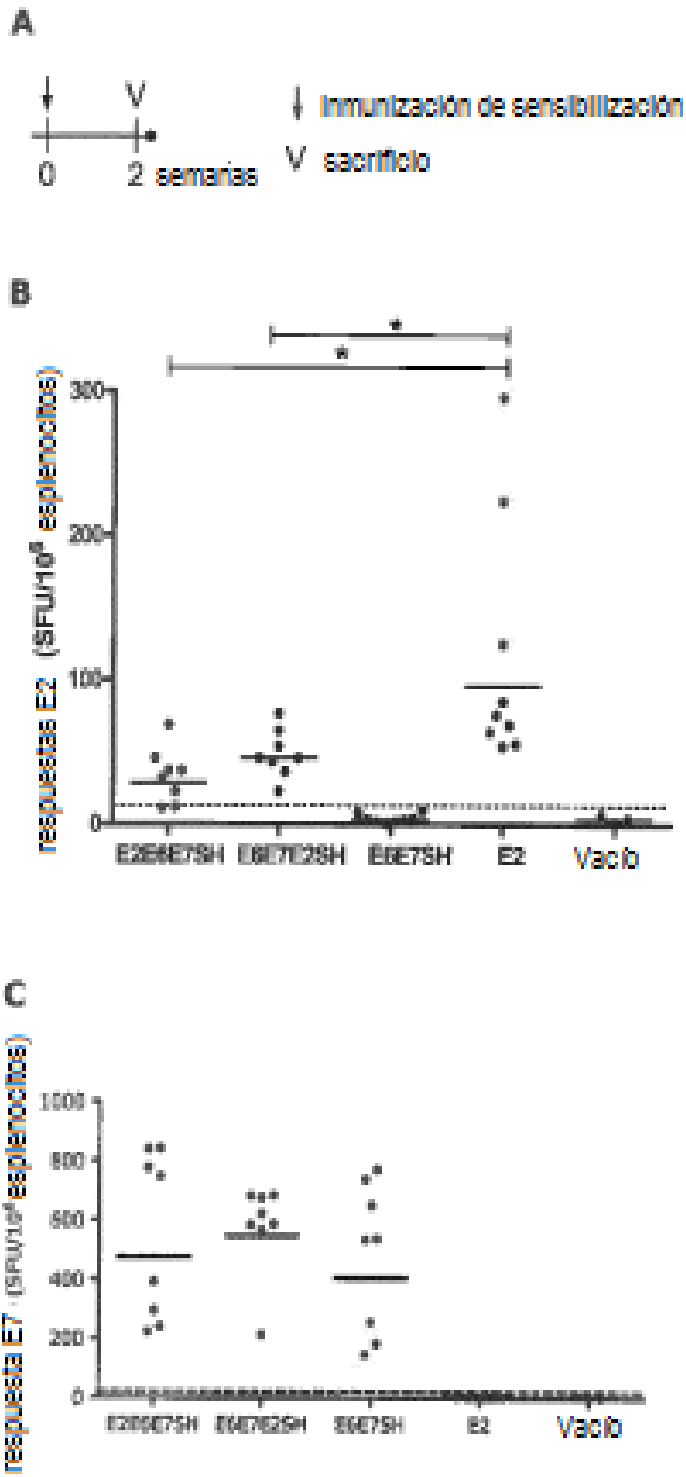


Fig. 8

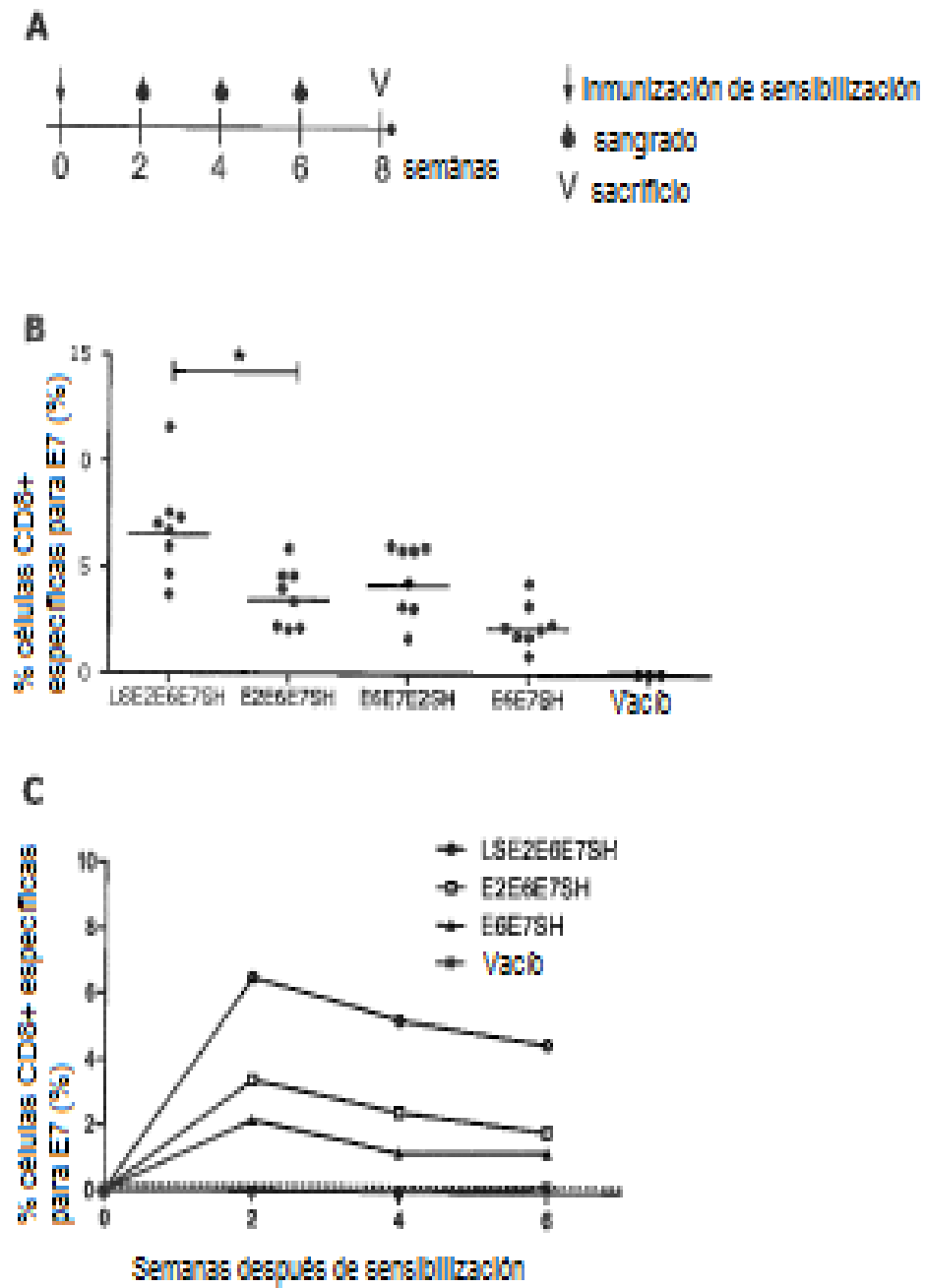


Fig. 9

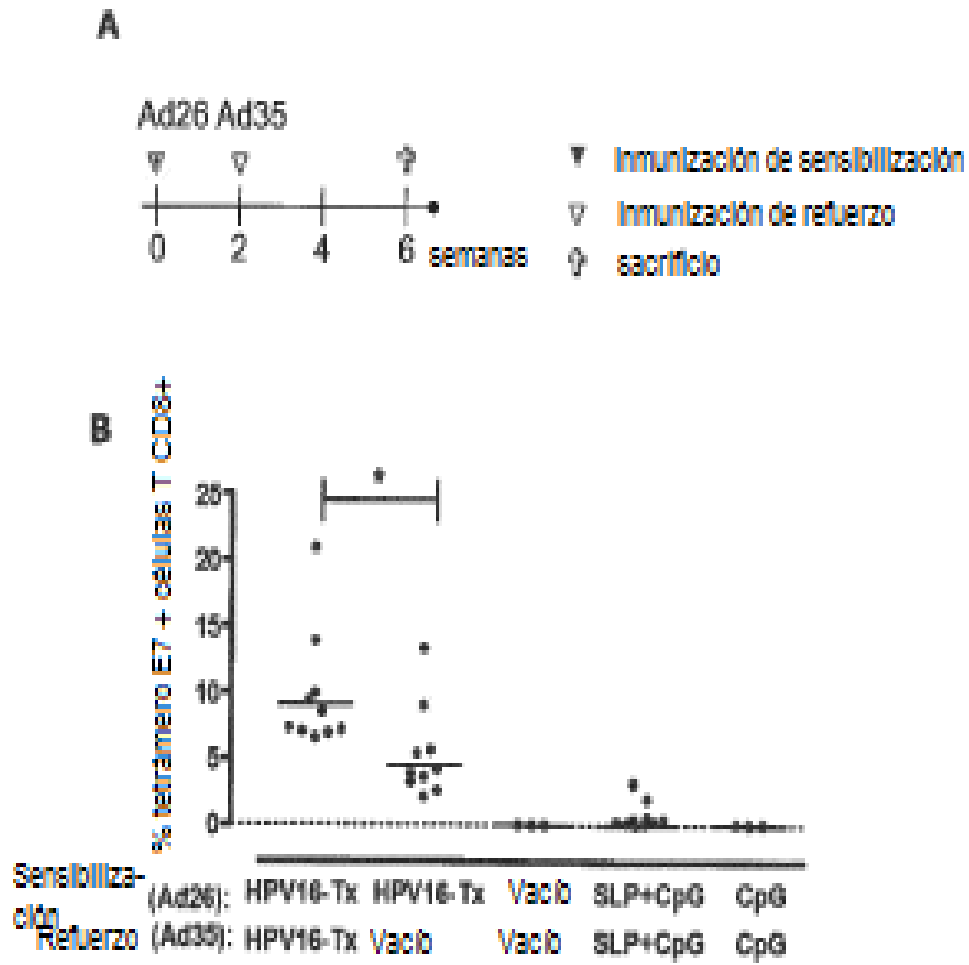


Fig. 10

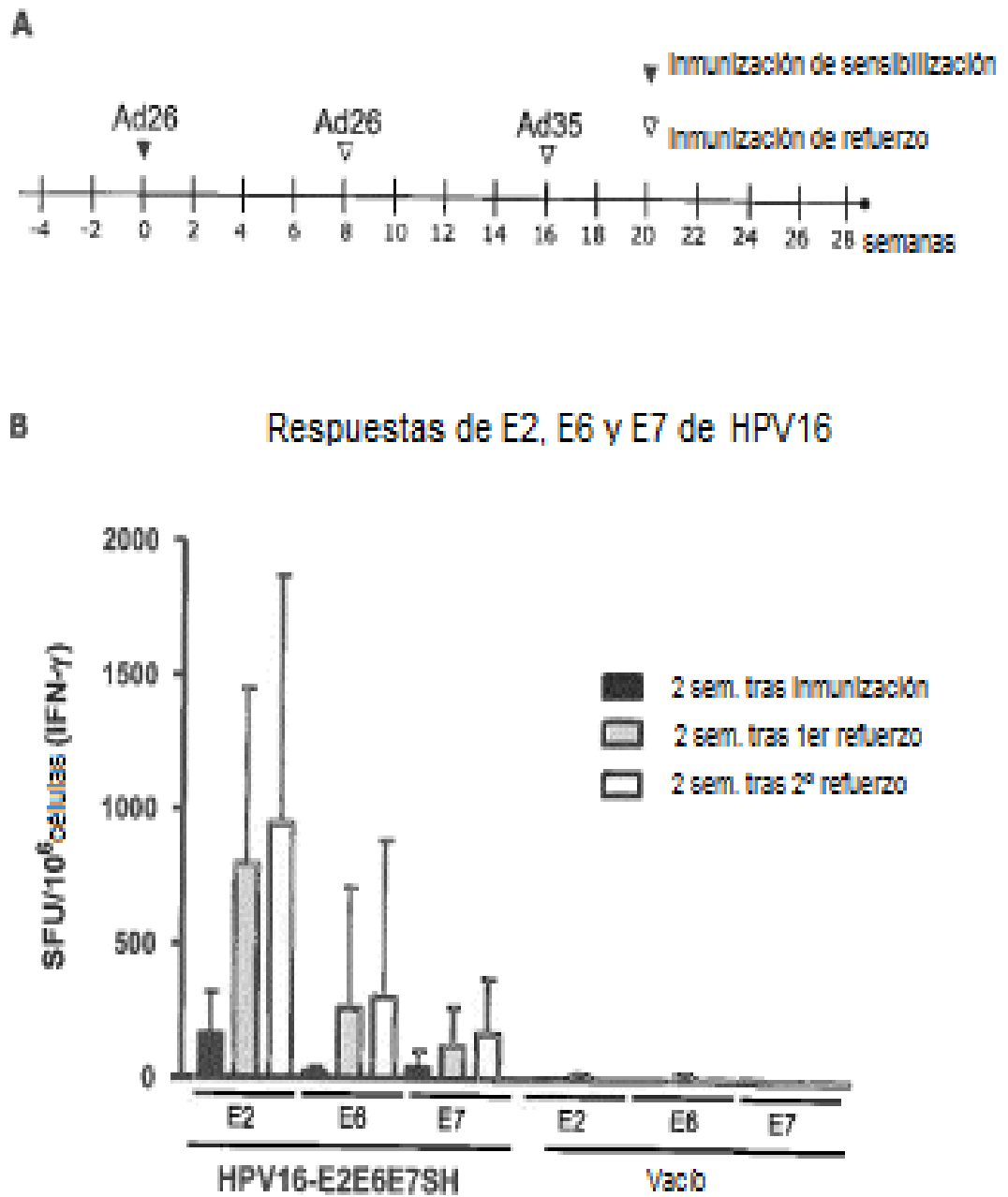


Fig. 11

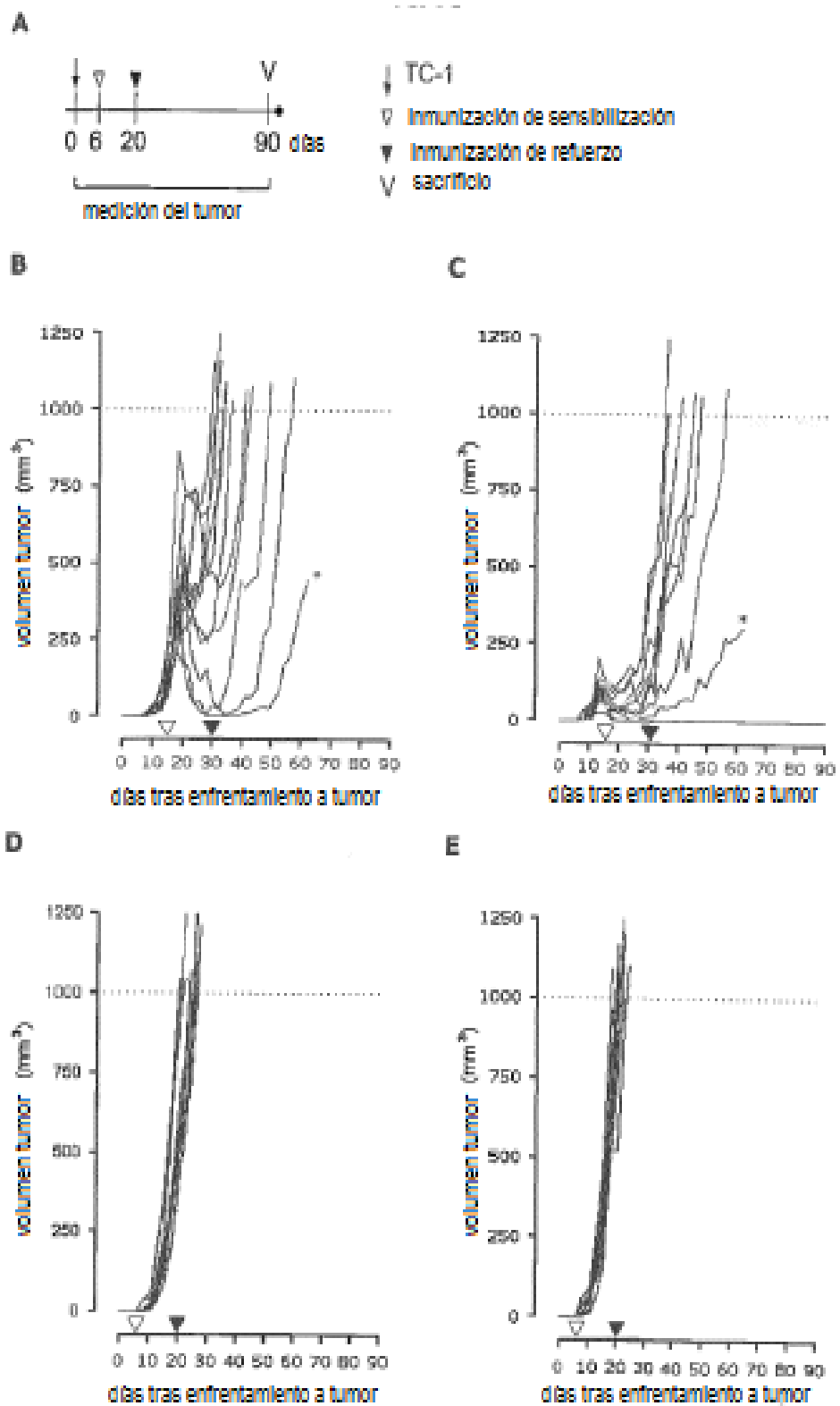


Fig. 12

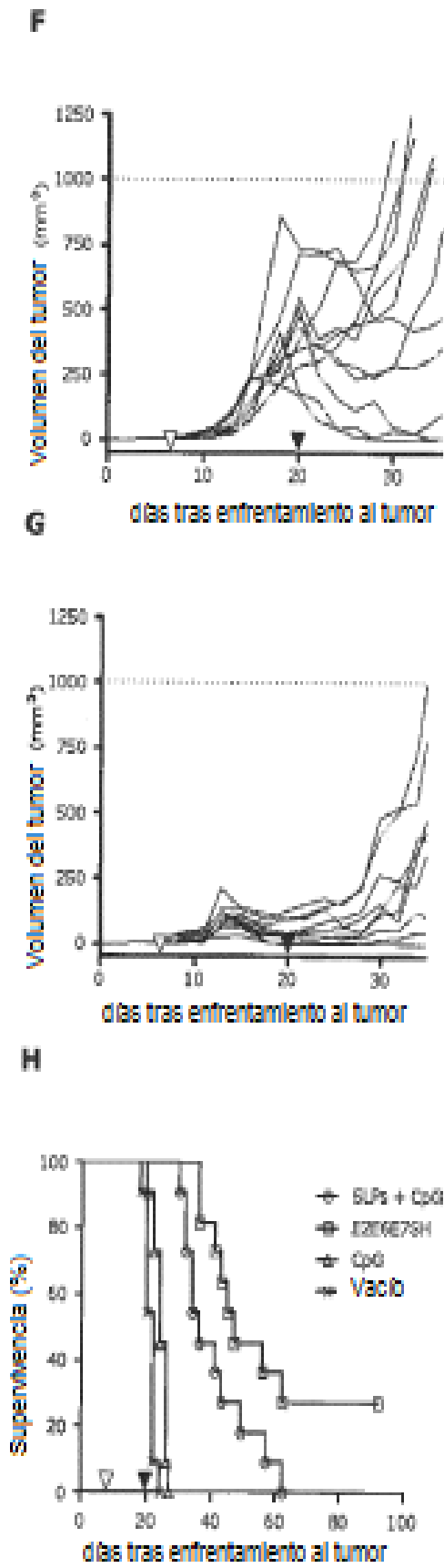


Fig. 12 - continuación

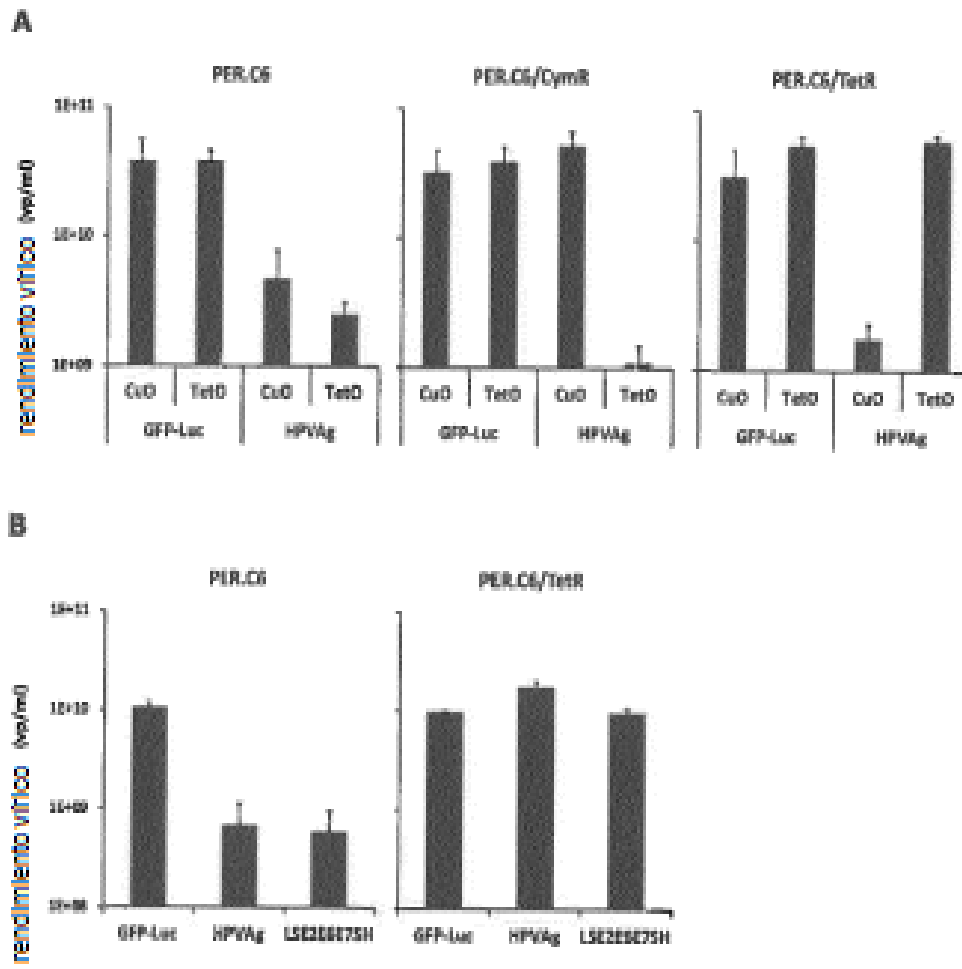


Fig. 13

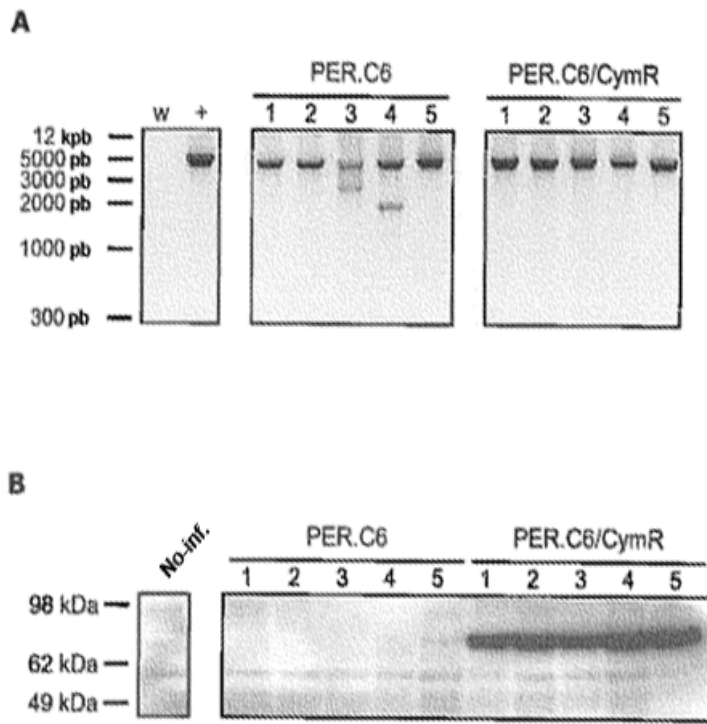


Fig. 14