

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 978**

51 Int. Cl.:

A61K 31/341 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 31/566 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2016 PCT/EP2016/060584**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16180892**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2016 E 16722201 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.09.2021 EP 3294288**

54 Título: **Inhibidores de la replicación del virus del papiloma humano**

30 Prioridad:

11.05.2015 US 201562159572 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2022

73 Titular/es:

**ICOSAGEN CELL FACTORY OÜ (100.0%)
Eerika tee 1
61713 Össu Ülenurme Tartumaa, EE**

72 Inventor/es:

**USTAV, MART SR.;
USTAV, ENE;
MÄNNIK, ANDRES;
TOOTS, MART y
TOVER, ANDRES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 901 978 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

Inhibidores de la replicación del virus del papiloma humano

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada en general con el área de la inhibición de la replicación vírica. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevos inhibidores del virus del papiloma humano. Asimismo, la divulgación se refiere a la identificación de moléculas diana para otros compuestos antivíricos.

10

Antecedentes

15

Los virus del papiloma humano (VPH) infectan los tejidos epiteliales de la piel y la mucosa. Los VPH son virus pequeños de ADN bicatenario que causan lesiones benignas y malignas en los epitelios. Las infecciones suelen ser eliminadas por el sistema inmunitario, sin embargo, pueden volverse persistentes y con el tiempo convertirse en diversos tipos de cáncer. Hasta la fecha, se han descrito al menos 205 tipos diferentes de VPH, 12 de ellos (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) se han clasificado como carcinógenos de clase 1A, también denominados VPH de alto riesgo (AR). Los tipos 16 y 18 son los más frecuentes. El cáncer más habitual asociado con los VPH es el cáncer de cuello uterino: se notificaron ~500 000 nuevos casos por año, principalmente en países en desarrollo, y 266 000 muertes en 2008. Por otra parte, se ha descubierto que VPH16 y VPH18 están asociados con aproximadamente 70 carcinomas invasivos del cuello uterino, así como cánceres de orofaringe, ano y otros tejidos mucosos. Por otro lado, los VPH de bajo riesgo no suelen estar relacionados con la malignidad.

20

25

Las terapias actuales para eliminar las lesiones causadas por los VPH incluyen diversos procedimientos citodestructivos y moléculas inmunomoduladoras, por ejemplo, imiquimod. El imiquimod no es específico para el VPH, pero se usa para tratar diversas dermatopatías, incluyendo el cáncer de piel, melanoma, molusco contagioso y otros. Además, hay tres vacunas disponibles contra los VPH: Gardasil (tipos 6, 11, 16 y 18), Gardasil 9 (tipos 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, 6 y 11) y Cevaxix (tipos 16 y 18). Los principales componentes activos de estas vacunas son las proteínas de la cápside L1 de los virus del VPH. Asimismo, estas vacunas son solo profilácticas y, además, la disponibilidad de las vacunas es limitada.

30

35

Los VPH codifican dos oncoproteínas principales, E6 y E7, que modifican el entorno celular para que sea más adecuado para la replicación del VPH al inducir la síntesis de ADN y la transformación celular. E6 y E7 tienen funciones cruciales en el desarrollo del cáncer relacionado con el VPH.

40

El ciclo de vida de los VPH depende estrictamente del programa de diferenciación celular. La infección comienza por la entrada del virus en células epiteliales basales indiferenciadas (posiblemente células madre) a través de microheridas. La infección se establece iniciando la amplificación inicial durante la cual el número de copias víricas alcanza hasta algunos cientos de copias por célula. A continuación viene la fase de mantenimiento estable, durante esta etapa, el genoma del VPH se replica aproximadamente una vez por ciclo celular y el número de copias víricas es constante. La expresión de genes víricos se mantiene a niveles muy bajos. La amplificación vegetativa y el ensamblaje de los viriones tiene lugar en células muy diferenciadas. Para replicar su genoma, los VPH dependen en gran medida de las proteínas celulares. Ellos por sí solos codifican solamente dos proteínas de replicación: E1 y E2. La E1 es una ADN helicasa dependiente de ATP, que inicia la replicación de la región no codificante del genoma del VPH - URR (LCR). También interactúa con diversas proteínas de replicación celular para facilitar la replicación vírica, por ejemplo, la topoisomerasa I, proteína de replicación A (RPA, por sus siglas en inglés) y polimerasa alfa. Para replicación, la proteína E2 forma un complejo con E1 y la dirige al origen de replicación. Además, E2 está implicada en la regulación de la expresión de genes víricos y une los genomas del VPH a los cromosomas mitóticos para una segregación eficiente.

50

55

El ADN celular es atacado constantemente por agentes exógenos o endógenos que dañan el ADN, tales como longitudes de onda UV o errores en la replicación. Para hacer frente a esto, las células tienen formas muy sofisticadas de garantizar la integridad del ADN, para evitar posibles mutaciones y tumorigénesis: Red de respuesta al daño del ADN (DDR). La red DDR está orquestada por diferentes cinasas (ATM, ATR y ADN-PK) y el daño en el ADN se repara mediante dos rutas principales: Recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés). En los últimos años se ha puesto de manifiesto que muchos virus no solo son capaces de activar la DDR sino que también se benefician de su activación. Los genomas del VPH se replican en determinados focos en el núcleo de la célula que contienen proteínas celulares necesarias en la DDR. Al activar la DDR, los VPH reclutan proteínas de replicación en estos focos que, a su vez, ayudan a replicar eficazmente los genomas víricos. La maquinaria de replicación del VPH usa la replicación dependiente de la recombinación homóloga durante la amplificación del genoma vírico, lo que da lugar a la acumulación de moléculas oligomerizadas que contienen al menos dos genomas.

60

65

Son proteínas importantes en la red DDR las tirosil-ADN-fosfodiesterasas Tdp1 y Tdp2, así como PARP1 (poli-(ADP-ribosa)-polimerasa 1). Las topoisomerasas como parte del complejo de escisión Top1/Top2 (Top1/2cc) son proteínas que relajan localmente los ácidos nucleicos que, de otro modo, están muy empaquetados, lo que es necesario para

su replicación y transcripción. Varios agentes exógenos y endógenos que dañan el ADN, sin embargo, causan la inmovilización de Top1/2cc-s. Los complejos de escisión inmovilizados causan roturas del ADN debido a la colisión de las horquillas de replicación. La Tdp1 es una enzima clave en la reparación del daño del ADN causado por Top1cc-s. Hidroliza el enlace fosfodiéster entre Top1 y el ADN, liberando de este modo Top1cc. La PARP1 (poli(ADP-ribosa)polimerasa-1) es una enzima que se une al ADN y cataliza la adición de polímeros de ADP-ribosa (PAR) a sus proteínas diana. Estas modificaciones regulan la localización celular y las actividades biológicas de diversas proteínas implicadas en la DDR. Recientemente se ha sugerido que PARP1 desempeña una función clave en la reparación dependiente de Tdp1 del daño del ADN inducido por Top1. Los inhibidores de Tdp1 junto con los inhibidores de PARP1 y/o topoisomerasa 1 se han considerado dianas en la terapia del cáncer.

Hay diferentes modelos de sistemas disponibles para estudiar diversas etapas del ciclo de vida del VPH. La mayor parte del trabajo se ha realizado en queratinocitos epiteliales primarios humanos. Sin embargo, el uso de estas células es relativamente costoso y consume mucho tiempo, especialmente para el cribado de alto rendimiento para identificar nuevos inhibidores de VPH. En la presente divulgación, se usó un sistema modelo basado en U2OS con sistema de luciferasa doble para medir el crecimiento celular/toxicidad de los compuestos y la replicación del genoma del VPH adecuado para el cribado de alto rendimiento (documento PCT/EP2016/057898). Este sistema permite estudiar las tres etapas de replicación de diversos VPH. La expresión génica de los VPH en las células U2OS es casi idéntica a la de los queratinocitos, lo que las hace adecuadas para la identificación de nuevos fármacos anti-VPH. Asimismo, el mecanismo de replicación y los intermedios de replicación de diversos subtipos de VPH parecen ser idénticos a los observados en diferentes líneas celulares de queratinocitos.

Los virus del papiloma humano son patógenos importantes responsables de un gran número de diversos casos de cáncer en todo el mundo. Independientemente de las dos vacunas existentes, existe la necesidad de antivíricos contra la infección por VPH porque las vacunas son solo preventivas y otros tipos de terapias han resultado ser infructuosas. Hasta el momento no hay disponibles inhibidores específicos del VPH. El cribado de alto rendimiento (HTS) de las bibliotecas químicas disponibles es una técnica ampliamente usada para identificar nuevos inhibidores contra diversos patógenos. Sin embargo, hasta ahora, no ha habido un sistema modelo adecuado para la detección de HT de los inhibidores del VPH.

La presente divulgación proporciona soluciones a los problemas descritos anteriormente.

Sumario

La presente divulgación proporciona la identificación de varios nuevos inhibidores de la replicación del VPH a través de un cribado de alto rendimiento del conjunto IV de diversidad del NCI y bibliotecas químicas personalizadas con Cl50 que varía entre 2,5 y 60 μ M. Estos compuestos son muy específicos de los VPH de alto riesgo. Al menos cuatro de estos compuestos inhiben la vía de Tdp1-PARP1-Top1cc caracterizando su efecto sinérgico con el inhibidor de la topoisomerasa I, camptotecina. Tdp1 y PARP1 se identifican como proteínas celulares esenciales necesarias para la replicación del VPH y, mediante el uso de los nuevos inhibidores, se muestra que son dianas farmacológicas válidas para el desarrollo de antivíricos adicionales.

Recientemente, los inventores han desarrollado un sistema basado en luciferasa doble compatible con HTS para medir la replicación del genoma del VPH (documento PCT/EP2016/057898). Mediante el uso de este sistema modelo para el cribado de la biblioteca del conjunto IV de diversidad del NCI, que consiste en diferentes clases de compuestos biológicamente activos, se identificaron 5 compuestos que inhibían la amplificación inicial del VPH18 en un intervalo micromolar bajo. Ninguno de los compuestos identificados inhibe la replicación de URR dependiente de E1 y E2. Además de la amplificación inicial, cuatro de los cinco compuestos inhibieron con éxito la fase de mantenimiento estable de la replicación vírica. Además, tres compuestos inhibieron la amplificación vegetativa que tiene lugar en epitelios superiores muy diferenciados. Por lo tanto, estos inhibidores o sus análogos son capaces de eliminar diferentes etapas de la infección por VPH.

También se sugieren compuestos adicionales como inhibidores potenciales debido a determinadas similitudes estructurales con los cinco compuestos identificados.

El primer objeto de esta invención es un compuesto antivírico para su uso en la inhibición de una o más fases de replicación del virus del papiloma humano de alto riesgo. Los rasgos característicos de dicho compuesto están representados en la reivindicación 1.

El segundo objeto de la presente invención es un método para inhibir una o más fases de replicación del VPH de alto riesgo *in vitro*. Las etapas características de dicho método están representadas en la reivindicación 6.

El tercer objeto de la presente invención es un medicamento para su uso en el tratamiento de una infección por VPH de alto riesgo. Los rasgos característicos de dicho medicamento están representados en la reivindicación 9. La presente divulgación describe compuestos eficaces para eliminar diferentes etapas de la infección por VPH.

La presente divulgación describe el tratamiento de células o un sujeto afectados por el virus del papiloma humano (p.

ej., *in vitro* o *in vivo*).

La presente divulgación describe compuestos para el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

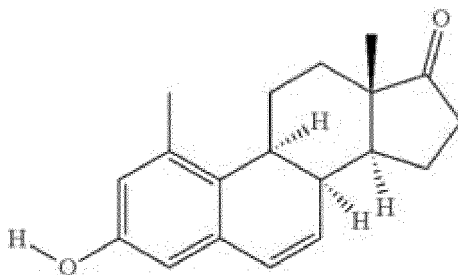
- 5 La presente divulgación describe un método para tratar la infección por VPH administrando al sujeto o poniendo en contacto células infectadas con una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos identificados y descritos en el presente documento.

- 10 La presente divulgación describe un método para tratar células afectadas por VPH que comprende poner en contacto las células con un compuesto descrito en el presente documento o una mezcla de los compuestos.

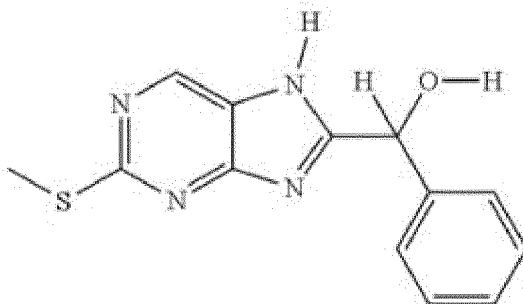
La presente divulgación describe un método para tratar células afectadas por VPH en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento.

- 15 La presente divulgación describe proporcionar un compuesto antivírico para inhibir una o más etapas de replicación del virus del papiloma humano, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

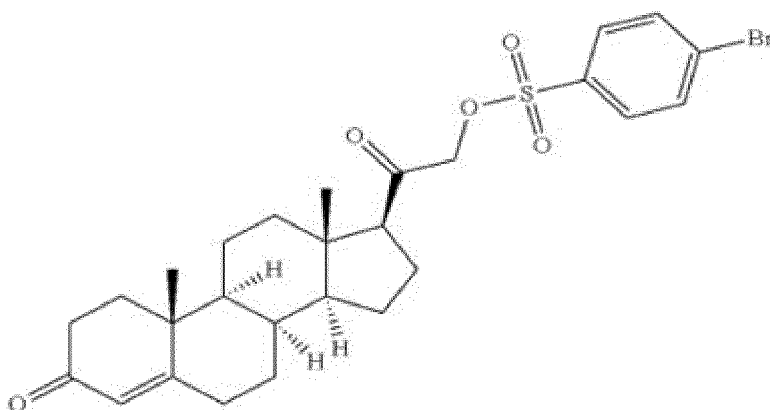
NSC 9782



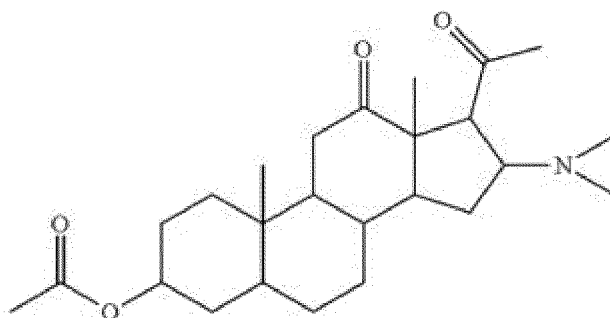
NSC 82269



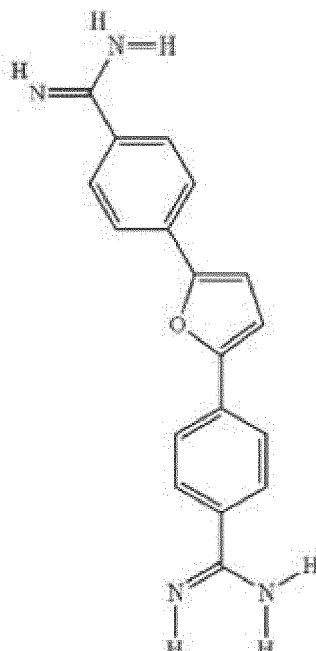
NSC 88915



NSC 109128



NSC 305831



5 La presente divulgación describe un compuesto antivírico contra el VPH de alto riesgo, en donde el compuesto inhibe las fases de amplificación inicial, mantenimiento estable y replicación vegetativa del VPH de alto riesgo y el compuesto se selecciona del grupo que consiste en: NSC109128, NSC305831 y NSC82269.

10 La presente divulgación describe un compuesto antivírico contra el VPH de alto riesgo, en donde el compuesto inhibe la amplificación inicial y el mantenimiento estable del VPH de alto riesgo, y el compuesto es NSC88915.

La presente divulgación describe un compuesto antivírico contra el VPH de alto riesgo, en donde el compuesto inhibe la fase de amplificación inicial del VPH de alto riesgo y el compuesto es NSC109128, NSC305831, NSC82269, NSC 88915 o NSC 9782.

15 Es un objeto de la presente divulgación describe un compuesto antivírico contra VPH 16 VPH 18, VPH31, VPH33, VPH45.

20 Otro objeto más de la presente divulgación describe un compuesto antivírico para inhibir una o más fases de replicación del virus del papiloma humano, en donde el compuesto inhibe la liberación del complejo de escisión de Topoisomerasa I TopIcc de un ADN del VPH de alto riesgo.

La presente divulgación describe un compuesto antivírico para inhibir una o más fases de replicación del VPH, en donde el compuesto inhibe la liberación al inhibir Tpd1 o PARP1.

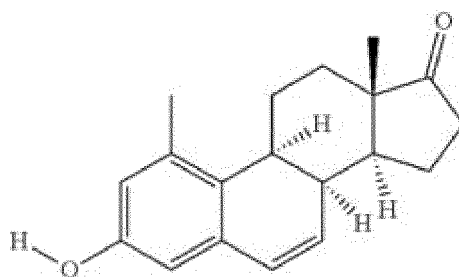
25 Además, la presente divulgación describe un método para tratar la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo

dicho método la administración o el contacto de células infectadas con un compuesto capaz de inhibir una o más fases de replicación del virus del papiloma humano, en donde el compuesto inhibe la liberación del complejo de escisión de Topoisomerasa I TopIcc de ADN del VPH.

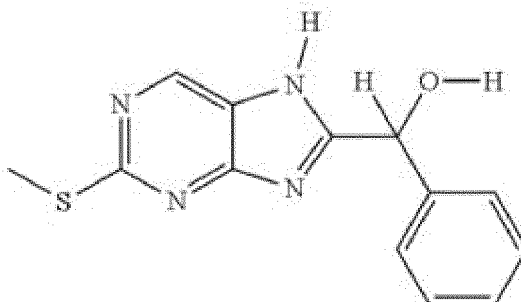
- 5 Adicionalmente, la presente divulgación describe un método para tratar la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho método la administración o el contacto de células infectadas con un compuesto capaz de inhibir una o más fases de replicación del virus del papiloma humano, en donde el compuesto inhibe Tpd1 o PARP 1.

- 10 Asimismo, la divulgación describe un método para tratar la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho método la administración o el contacto de la célula infectada con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

NSC 9782

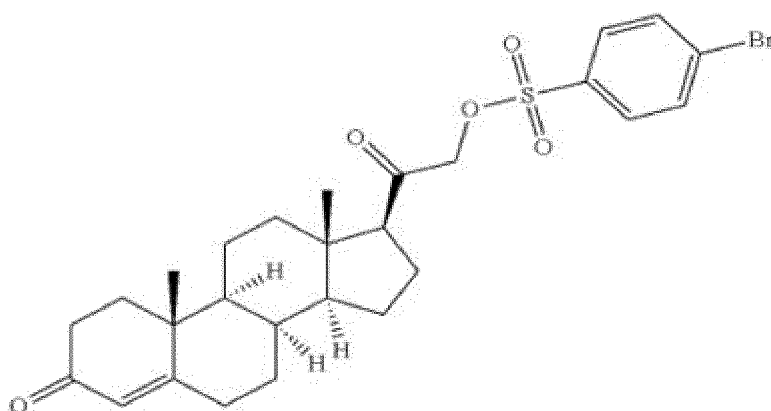


NSC 82269

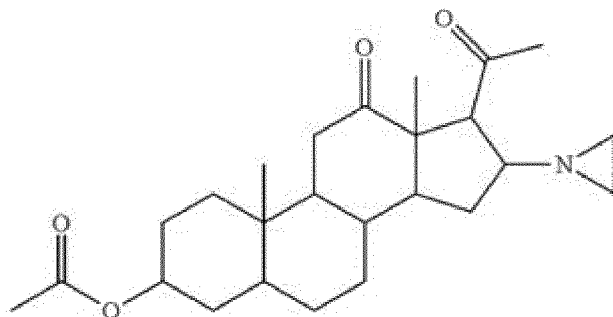


15

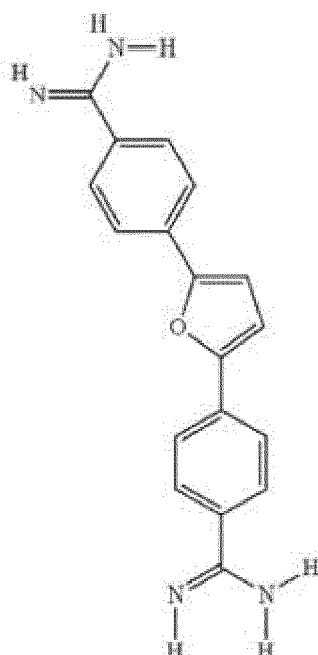
NSC 88915



NSC 109128



NSC 305831

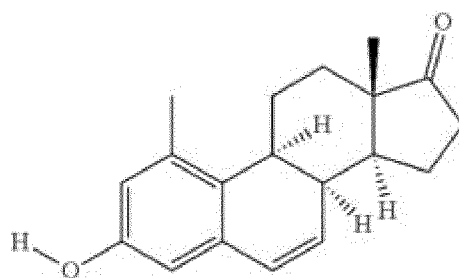


5 La presente divulgación describe un método para inhibir una o más fases de replicación del VPH de alto riesgo *in vitro* o *in vivo*, comprendiendo dicho método una etapa de poner en contacto la célula infectada con un compuesto que inhibe la liberación del complejo de escisión de Topoisomerasa I Top1cc de ADN del VPH.

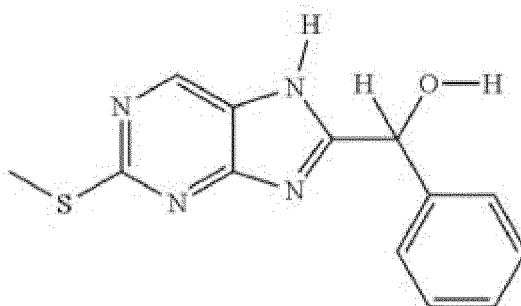
10 La presente divulgación describe un método para inhibir una o más fases de replicación del VPH de alto riesgo *in vitro* o *in vivo*, comprendiendo dicho método una etapa de poner en contacto la célula infectada con un compuesto que inhibe Tpd1 o PARP 1.

15 La presente divulgación describe un método para inhibir una o más fases de replicación del VPH de alto riesgo *in vitro* o *in vivo*, comprendiendo dicho método una etapa de poner en contacto la célula infectada con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

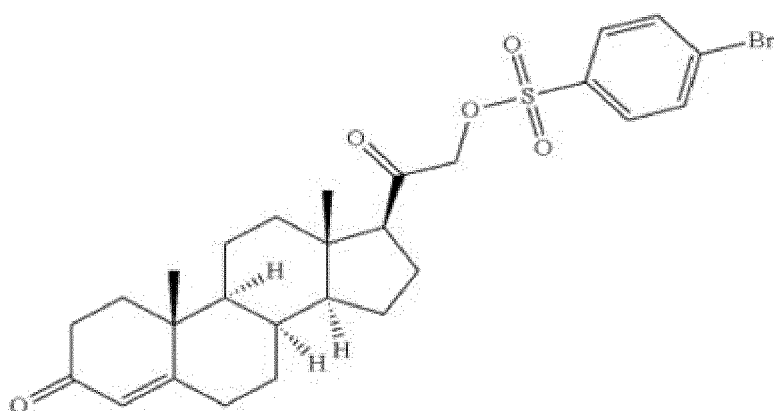
NSC 9782



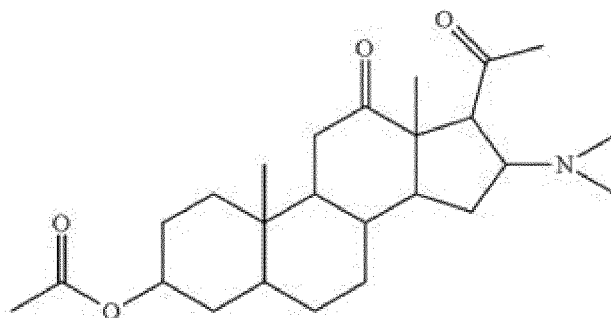
NSC 82269



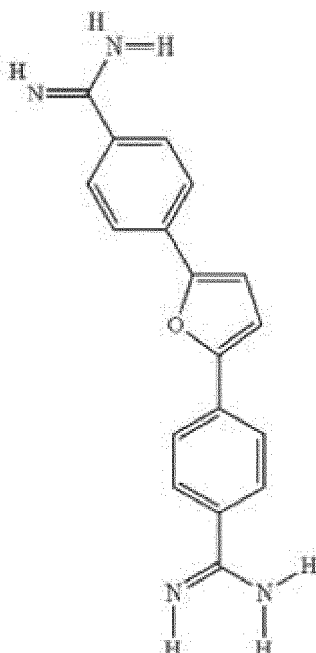
NSC 88915



NSC 109128



NSC 305831

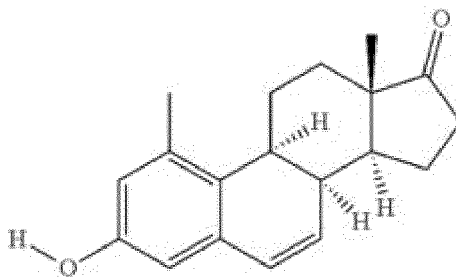


Además, la presente divulgación describe un medicamento para tratar la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho medicamento uno o más de los compuestos que inhiben la liberación del complejo de escisión de Topoisomerasa I TopIcc de ADN del VPH.

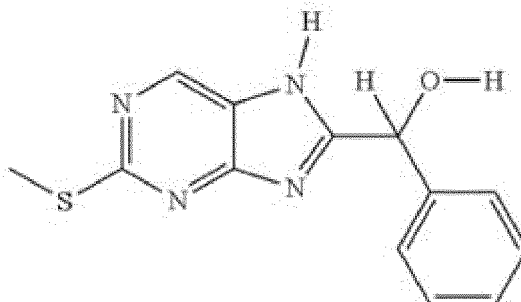
La divulgación describe un medicamento para tratar la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho medicamento uno o más compuestos que inhiben Tpd1 o PARP.

10 Aún más, la divulgación describe un medicamento para tratar la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho medicamento uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en

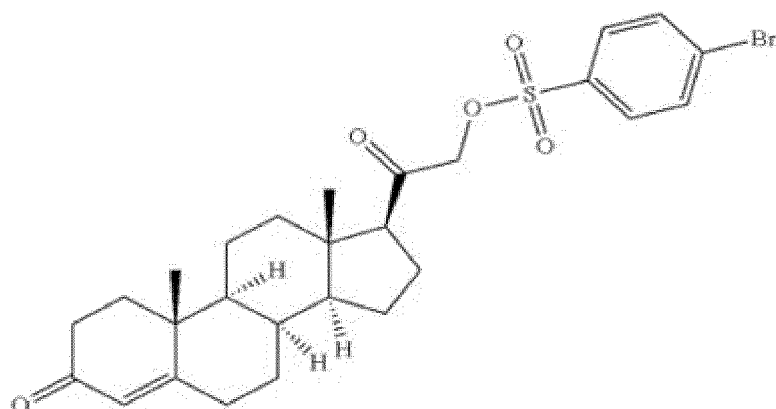
NSC 9782



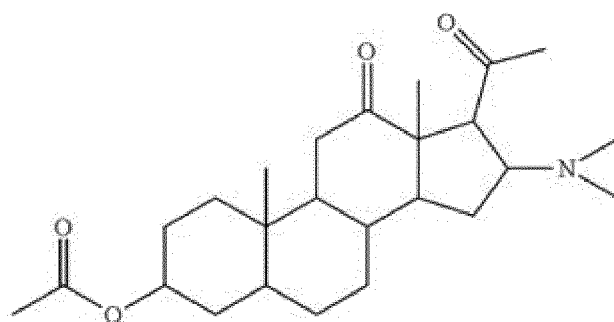
NSC 82269



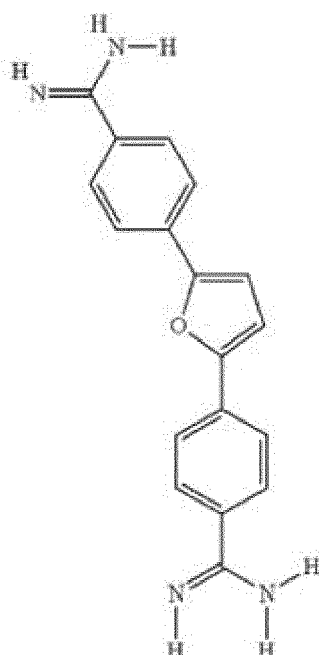
NSC 88915



NSC 109128

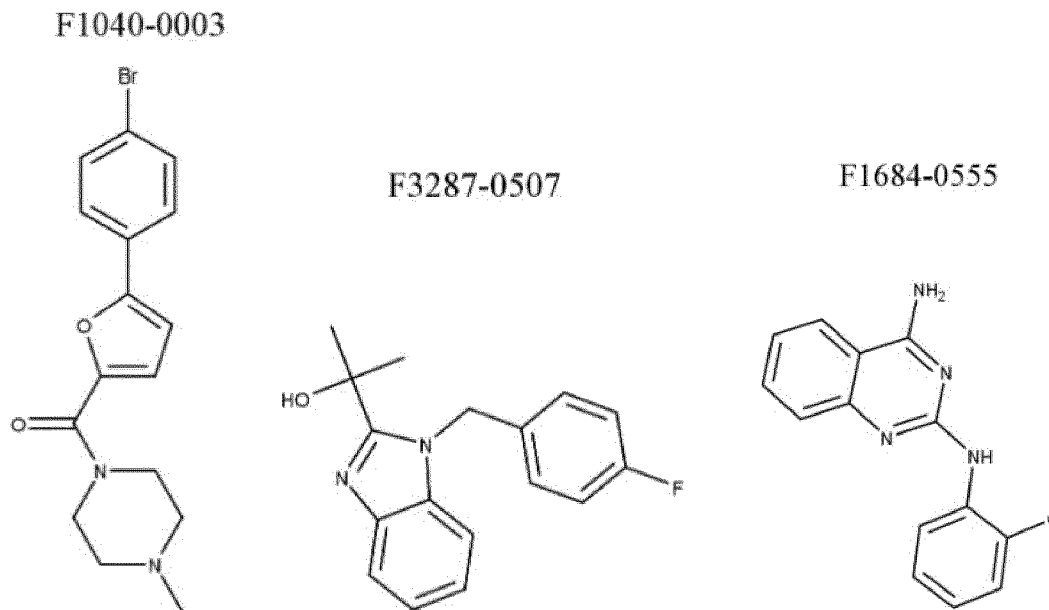


NSC 305831

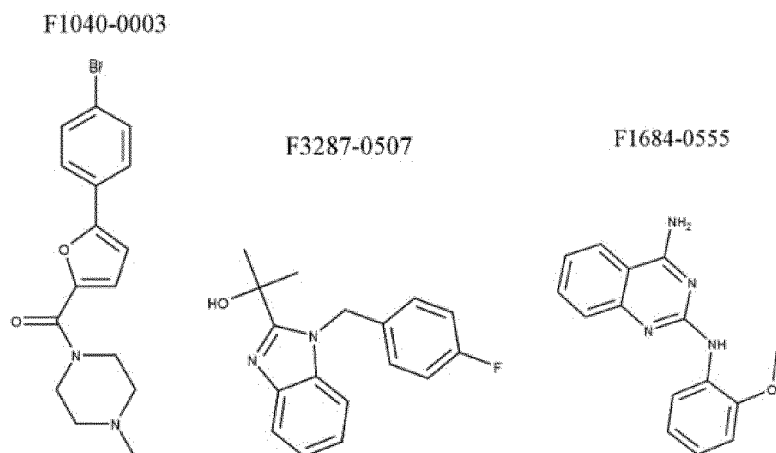


Además, la presente divulgación describe un método para identificar compuestos antivíricos potenciales para la inhibición de la replicación del genoma del VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho método la detección de compuestos capaces de inhibir Tdp1 y PARP 1.

5 Aún más, esta divulgación describe inhibidores potenciales de la infección por VPH o inhibidores potenciales de una o más fases de replicación del VPH, seleccionándose dichos inhibidores del grupo que consiste en



La divulgación describe un medicamento para tratar infecciones por VPH, comprendiendo dicho medicamento uno o más de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en



Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Estructuras bidimensionales esquemáticas de los cinco inhibidores de la replicación del VPH-AR identificados durante el cribado HT del conjunto IV de diversidad del NCI.

Figura 2 Efecto de los cinco compuestos identificados sobre la amplificación inicial del VPH18. A: Se transfectaron células U2OS con minicírculo ts de VPH18 y se cultivaron en presencia de los compuestos con las concentraciones indicadas durante 5 días. El ADN genómico se extrajo, se linealizó y se digirió con DpnI. Las señales de replicación del genoma del VPH se detectaron usando análisis de transferencia de Southern y se cuantificaron con lector de fósforo fotoestimulable y se expresaron en relación con el control del vehículo (DMSO). Se muestran los valores de CI50 aproximados para cada compuesto. Las barras de error representan la desviación típica de al menos tres experimentos independientes. B: Se transfectaron células U2OS con los vectores de expresión de las proteínas E1 y E2 de VPH18 junto con el plásmido en minicírculo de URR (origen) de VPH18. Las células se cultivaron en presencia de los compuestos con las concentraciones indicadas durante 24 o 48 horas. El ADN genómico se extrajo, se linealizó y se digirió con DpnI. Las señales de replicación de URR del VPH se detectaron mediante análisis de transferencia de Southern. DMSO actúa como control del vehículo y M 18URR actúa como marcador de tamaño.

Figura 3 Efecto de los compuestos sobre el mantenimiento estable y la amplificación vegetativa del VPH18. A: Se

cultivaron células U2OS n.º 1.13 en condiciones subconfluentes en presencia de los cinco compuestos identificados durante 7 días. El ADN genómico se extrajo, se linealizó y la señal de replicación del VPH se detectó mediante transferencia de Southern y B: se cuantificó mediante lector de fósforo fotoestimulable. C: Se sembraron U2OS n.º 1.13 y se cultivaron durante 5 días sin dividir. El 5º día se añadieron al medio las concentraciones indicadas de compuestos y las células se cultivaron durante 7 días adicionales sin dividir. El 12º día el ADN genómico se extrajo, se linealizó y la señal de replicación del VPH se detectó mediante transferencia de Southern y D: se cuantificó mediante lector de fósforo fotoestimulable. Las barras de error representan las desviaciones típicas de al menos dos experimentos independientes.

Figura 4 Participación de Tdp1 y PARP1 en la amplificación inicial de VPH18. A: Se transfectaron células U2OS con minicírculo ts del VPH18 y plásmido sh_Tdp1. El ADN genómico se extrajo 3 y 4 días después de la transfección, se linealizó y se digirió con DpnI. La señal de replicación del VPH se detectó con análisis de transferencia de Southern y B: se cuantificó con lector de fósforo fotoestimulable. C: Análisis de transferencia de Western que muestra la regulación negativa de la proteína Tdp1 por ARNhc. D: Se transfectaron células U2OS con minicírculo ts del VPH18 y plásmido sh_PARP1. La señal de replicación del VPH se detectó con análisis de transferencia de Southern y E: se cuantificó con lector de fósforo fotoestimulable. F: Análisis de transferencia de Western que muestra la regulación negativa de la proteína PARP1 por ARNhc. G: Se transfectaron células U2OS con minicírculo ts VPH18 y se cultivaron durante 3 y 4 días en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de PARP1 ABT-888. La señal de replicación del VPH se detectó con análisis de transferencia de Southern y H: se cuantificó con lector de fósforo fotoestimulable. Las barras de error representan las desviaciones típicas de al menos tres experimentos independientes.

Figura 5 Efecto sinérgico entre camptotecina (CPT) y los cinco compuestos identificados. Se transfectaron células U2OS-EBNA1 con plásmidos oriP y ts de VPH18 y se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de los compuestos solos o junto con CPT 2 nM durante 5 días. El ADN genómico se extrajo, se linealizó y se digirió con DpnI. Las señales de replicación tanto de VPH18 como de oriP se detectaron con transferencia de Southern y se cuantificaron mediante lector de fósforo fotoestimulable. Los compuestos 109128, 88915, 9782 y 305831 muestran una clara inhibición sinérgica junto con CPT (paneles C-J), mientras que el compuesto 82269 no (paneles A y B). Las barras de error representan las desviaciones típicas de al menos tres experimentos independientes.

Figura 6 Efecto de los cinco compuestos identificados sobre diferentes tipos de VPH. Se transfectaron células U2OS con 3 µg de VPH 5, 2 µg del VPH11 y 5 µg de minicírculos del VPH16 y se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de compuestos durante 5 días. El ADN genómico se extrajo, se linealizó y se digirió con DpnI. La señal de replicación del VPH se cuantificó usando qPCR. A: Efecto sobre VPH5. B: Efecto sobre VPH11. C: Efecto sobre VPH16 Las barras de error representan desviaciones típicas de dos experimentos independientes. D, E y F: Las células U2OS se transfectaron con 2 µg de minicírculo del VPH33, 5 µg de minicírculo del VPH45 y 2 µg del genoma de VPH31 religado y se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de compuestos durante 5 días. El ADN episómico se extrajo usando el método de extracción de ADN de HIRT, se linealizó y se digirió con DpnI. Señal de replicación del VPH detectada por análisis de transferencia de Southern. La flecha negra indica la señal del VPH replicada.

Descripción detallada

Definiciones

Como se han usado a lo largo de la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados. Si falta una definición, prevalece la definición convencional conocida por un experto en la materia. Si una definición proporcionada en el presente documento entra en conflicto o es diferente de una definición proporcionada en cualquier publicación citada, prevalece la definición proporcionada en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "que incluye", "que contiene" y "que comprende" se usan en su sentido abierto, no limitante.

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" abarca mamíferos y animales que no son mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitación, cualquier miembro de la clase de mamíferos: seres humanos; primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja, tales como ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos, tales como conejos, perros y gatos; y animales de laboratorio, incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas, y similares. Los ejemplos de animales que no son mamíferos incluyen, pero sin limitación, aves, peces y similares. En una realización de la presente invención, el mamífero es un ser humano.

El término "inhibidor" se refiere a una molécula tal como un compuesto, un fármaco, un activador enzimático o una

hormona que bloquea o interfiere con una actividad biológica particular. La expresión "inhibidor de la replicación del VPH" significa un compuesto capaz de inhibir, bloquear o interferir parcial o totalmente con una o más fases del ciclo de replicación del VPH.

- 5 Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad suficiente del agente para proporcionar el resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o afección médica, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para uso terapéutico es la cantidad de un compuesto, o de una composición que comprende el compuesto, que es necesaria para proporcionar un cambio clínicamente relevante en una patología, síntoma o afección médica. Un experto habitual en la materia puede determinar una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual usando experimentación rutinaria. Por tanto, la expresión "cantidad eficaz" se refiere en general a la cantidad para la que la sustancia activa tiene un efecto terapéuticamente deseado.

- 15 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" abarcan el tratamiento tanto "preventivo" como "curativo". Se entiende que el tratamiento "preventivo" indica un aplazamiento del desarrollo de una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o afección médica, suprimiendo los síntomas que puedan aparecer o reduciendo el riesgo de aparición o recaída de una enfermedad o síntoma. El tratamiento "curativo" incluye reducir la gravedad o suprimir el empeoramiento de una enfermedad, síntoma o afección existente. Por tanto, el tratamiento incluye aliviar o prevenir el empeoramiento de los síntomas de la enfermedad existente, prevenir la aparición de síntomas adicionales, aliviar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir el trastorno o la enfermedad, p. ej., detener el desarrollo del trastorno o enfermedad, aliviar el trastorno o la enfermedad, causar la regresión del trastorno o enfermedad, aliviar una afección causada por la enfermedad o trastorno o detener los síntomas de la enfermedad o trastorno.

- 25 La presente divulgación también se refiere a profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos identificados y métodos de tratamiento que emplean tales profármacos farmacéuticamente aceptables. El término "profármaco" significa un precursor de un compuesto designado que, después de la administración a un sujeto, produce el compuesto *in vivo* a través de un proceso químico o fisiológico tal como solvolisis o escisión enzimática, o en condiciones fisiológicas (p. ej., un profármaco al ser llevado a pH fisiológico se convierte en el compuesto). Un "profármaco farmacéuticamente aceptable" es un profármaco que no es tóxico, es biológicamente tolerable y es de otro modo adecuado para formulación y/o administración al sujeto. Se describen procedimientos ilustrativos para la selección y preparación de derivados de profármaco adecuados, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. Los ejemplos de profármacos incluyen ésteres farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación, que también se consideran parte de la divulgación.

- 35 La replicación o amplificación inicial o la replicación o amplificación transitoria se refiere a la replicación del ADN del VPH en el momento del establecimiento de la infección.

- 40 El mantenimiento estable o mantenimiento latente se refiere a la etapa latente del ciclo de replicación vírica en la que el ADN vírico se mantiene estable en un número de copias casi constante en las células hospedadoras en división.

La replicación de amplificación vegetativa o replicación de amplificación tardía se refiere a la amplificación exponencial del ADN vírico en queratinocitos muy diferenciados en las partes superiores del epitelio.

- 45 Los virus del papiloma humano son patógenos importantes responsables de un gran número de diversos casos de cáncer en todo el mundo. Independientemente de las dos vacunas, todavía existe la necesidad de antivíricos contra la infección por VPH porque las vacunas son solo preventivas y otros tipos de terapias han resultado ser infructuosas. Hasta el momento no hay disponibles inhibidores específicos del VPH. El cribado de alto rendimiento (HTS) de las bibliotecas químicas disponibles es una técnica ampliamente usada para identificar nuevos inhibidores contra diversos patógenos. Sin embargo, el HTS requiere sistemas modelos adecuados que permitan medir de manera rápida y precisa el efecto de los compuestos químicos en la diana o dianas. Recientemente, los inventores han desarrollado un sistema basado en luciferasa doble compatible con HTS para medir la replicación del genoma del VPH (documento PCT/EP2016/057898). Aquí se usó este sistema modelo para el cribado de la biblioteca del conjunto IV de diversidad del NCI, que consiste en diferentes clases de compuestos que han mostrado algún tipo de actividad biológica. Se identificaron 5 compuestos (figura 1) que inhibieron la amplificación inicial de VPH18 en intervalo micromolar bajo (figura 2, panel A). Se han llevado a cabo varios estudios acerca de la replicación del VPH midiendo la replicación dependiente de E1 y E2 del plásmido URR (que contiene el origen o la replicación) del VPH. Incluso se ha desarrollado un sistema modelo de HTS para medir la replicación de URR. Los compuestos identificados aquí no inhiben la replicación de URR dependiente de E1 y E2 (figura 2, panel B), lo que indica que podrían usarse diferentes proteínas celulares para facilitar la replicación del genoma del VPH y/o que el mecanismo de replicación del genoma vírico difiere de la replicación del plásmido URR. Además de la amplificación inicial, cuatro de los cinco compuestos inhibieron con éxito la fase de mantenimiento estable de la replicación vírica (figura 3, panel A). Además, tres compuestos inhibieron la amplificación vegetativa que tiene lugar en epitelios superiores muy diferenciados (figura 3, panel B). Por lo tanto, estos inhibidores o sus análogos son capaces de eliminar diferentes etapas de la infección por VPH.

- 65 Ha quedado claro en los últimos años que los VPH activan la red de respuesta al daño del ADN durante su replicación

para "invitar" la replicación celular y las proteínas de reparación del ADN a sus focos de replicación. Por otra parte, se ha mostrado que el VPH usa la recombinación homóloga para replicar eficientemente su genoma. Sin embargo, el mecanismo exacto y todos los socios celulares necesarios aún son desconocidos. La Tdp1 libera el Top1cc inmovilizado del ADN y, de este modo, evita la colisión de la horquilla de replicación/transcripción. La Tdp1 no es una proteína absolutamente necesaria durante la replicación normal, ya que los complejos de escisión de Top1 quedan inmovilizados debido a determinados tipos de daños del ADN. Aquí se muestra que la Tdp1 junto con su proteína reguladora PARP1 son socios celulares importantes en la replicación del VPH18 (figura 4), lo que hace que esas proteínas sean buenas dianas para desarrollar inhibidores del VPH. La camptotecina (CPT) es un inhibidor de la topoisomerasa I, estabiliza el complejo de Top1cc-ADN. En la presente divulgación se muestra que cuatro de los cinco compuestos identificados muestran inhibición sinérgica de la amplificación inicial del VPH18 con CPT, lo que sugiere que inhiben Tdp1 o tienen alguna otra diana relacionada con la liberación de complejos Top1cc del ADN (figura 5). Estos resultados sugieren que en algún momento durante la replicación del VPH, los complejos Top1cc quedan atrapados en el genoma vírico. La Tdp1 parece ser activado probablemente por PARP1 y reclutado en el ADN del VPH donde libera los complejos que permiten que continúe la replicación. Cuando se inhibe la Tdp1, surgen intermedios de replicación anómalos y la replicación del VPH no se puede completar. Ninguno de los compuestos inhibió la replicación del VPH11 o VPH5 (figura 6), lo que indica que el Top1cc no está inmovilizado en esos genomas del VPH y, por lo tanto, Tdp1 no es necesario o no es un factor limitante para la replicación cutánea o de bajo riesgo del VPH. Es posible que el E1 del VPH de alto riesgo o algunas otras proteínas interactúen con Tdp1 y lo lleven a los sitios de replicación, pero las proteínas de VPH cutáneas o de bajo riesgo no lo hacen.

Durante este trabajo, se usó un sistema modelo de detección de HT del VPH que los inventores desarrollaron para detectar compuestos capaces de inhibir la replicación del genoma del VPH. Los inventores han identificado cinco compuestos: tres de ellos inhiben todas las etapas de replicación del VPH, uno de ellos inhibe la amplificación inicial y el mantenimiento estable y uno solo la amplificación inicial. Además, se muestra aquí por primera vez que durante la replicación del VPH18, probablemente debido al daño del ADN, los complejos de escisión de la topoisomerasa I quedan atrapados en el genoma vírico. Para continuar con la replicación normal, la Tdp1 junto con PARP1 son necesarios para liberar el Top1cc del genoma del VPH. La inhibición de la liberación del Top1cc del ADN del VPH actúa como una diana prometedora para el desarrollo de antiviricos.

La presente invención proporciona compuestos para tratar células infectadas por VPH. La divulgación proporciona además un método para tratar células infectadas por VPH que comprende poner en contacto las células con una cantidad eficaz de un compuesto antivírico de la presente invención. Un sujeto infectado con el VPH se puede tratar mediante un método, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente divulgación. El compuesto se puede administrar en forma de una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de la invención son las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden uno o más compuestos antivíricos identificados en la presente divulgación. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir transportadores, adyuvantes o vehículo y, como alternativa, uno o más agentes activos adicionales.

Las composiciones farmacéuticas, según el método de la presente divulgación, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o atenuar la gravedad de una infección por VPH o enfermedad.

La cantidad exacta necesaria variará entre sujetos, dependiendo de la especie, la edad, el sexo, el peso, la dieta, el estado médico y estado general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración y similares.

La administración de los compuestos puede ser una sola dosis diaria, múltiples dosis espaciadas a lo largo del día, una sola dosis cada dos días, una sola dosis cada varios días o cualquier otro régimen apropiado. La dosis se puede determinar de forma rutinaria usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica (en forma de polvos, pomadas o gotas), por vía bucal, como pulverizador oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se trate.

Pueden formularse preparaciones inyectables según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados.

Las composiciones para administración rectal o vaginal pueden ser supositorios que comprenden uno o más compuestos identificados en la presente divulgación con excipientes o vehículos no irritantes adecuados.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de

dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

Las formulaciones orales también pueden ser jarabes y elixires.

- 5 Las formas farmacéuticas para administración tópica y/o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario, según se requiera. Adicionalmente, la presente divulgación contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al
- 10 organismo. Dichas formas de dosificación se preparan disolviendo o distribuyendo el compuesto en el medio adecuado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.
- 15 Se puede administrar más de un compuesto de la invención por separado, simultánea o secuencialmente a las células infectadas, al tejido que contiene las células infectadas o a sujetos infectados.

También se apreciará que los compuestos y las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden emplearse en terapias combinadas, es decir, los compuestos y las composiciones farmacéuticamente aceptables se pueden administrar simultáneamente con, antes de o después de, uno o más agentes terapéuticos o procedimientos médicos deseados distintos.

La invención se describe ahora mediante algunos ejemplos no limitantes.

25 *Métodos usados en los experimentos*

Líneas celulares y transfección. U2OS (ATCC n.º: HTB-96), U2OS-EBNA1 (Icosagen Cell Factory OU), U2OS-GFP-Fluc n.º 10.15 (número de depósito de DMSZ ACC3258) se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) complementado con suero de ternero fetal al 10 % (FCS). Todas las líneas celulares U2OS se transfectaron mediante electroporación (220 V; 975 µF) con un Gene Pulser X-cell de Bio-Rad provisto de un extensor de capacidad (Bio-Rad Laboratories).

Plásmidos. El plásmido precursor pMC-HPV18 para la producción de minicírculos ts del VPH18 se construyó añadiendo el sitio de restricción BglII (usado para la clonación en el vector pMC.BESBX [54]) en el genoma del VPH18 entre el nt. 7473 y el nt. 7474 (en el presente documento, la numeración del genoma del VPH18 es según la secuencia de referencia del NCBI NC_001357.1) que no ha mostrado alteraciones en la expresión y replicación génica. El plásmido precursor pMC-HPV18-RlucE2 (número de depósito de DMSZ DSM 29865) se construyó basándose en el pMC-HPV18. El plásmido precursor pMC-HPV5 se construyó usando el sitio de restricción XmaI en el ORF de la proteína L2. El plásmido precursor pMC-HPV11 se construyó usando el sitio de restricción BamHI en el genoma del VPH11. El plásmido precursor pMC-HPV33 se construyó usando el sitio de restricción Eco81I en el genoma del VPH33. El plásmido precursor pMC-HPV45 se construyó usando el sitio de restricción AscI en el genoma del VPH45. La secuencia del genoma del VPH31 clonada en el vector pBR322 se obtuvo del Centro Internacional de Referencia del Virus del Papiloma Humano (VPH). El plásmido precursor pMC-HPV18URR contiene 206 nucleótidos del final del ORF de L1, URR de VPH18 de longitud completa y 14 nucleótidos del comienzo del ORF de E6. Este fragmento se clonó en el sitio BglI en el vector pMC.BESBX. El vector pMC.BESBX contiene el origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a la kanamicina necesarios para la propagación en células bacterianas y elementos adicionales para la producción de minicírculos. Los genomas del VPH en minicírculo se produjeron en la cepa de *E. coli* ZYCY10P3S2T como se describe en [54]. El pMC-HPV que contiene la cepa de *E. coli* ZYCY10P3S2T se cultivó en medio Terrific Broth (Life Technologies) a 37 °C durante 16-18 h, después de lo cual se añadió una cantidad igual de medio LB que contenía L-arabinosa al 0,02 % y NaOH 20 mM y se hizo crecer el cultivo a 32 °C durante 8 horas para inducir la recombinación y la producción de minicírculos superenrollados. Finalmente, los genomas del VPH se purificaron de *E. coli* con el equipo QIAfilter Plasmid (Qiagen). Los genomas de VPH en minicírculo resultantes tienen menos de 100 pb de secuencia que no es de VPH. Para la generación del genoma de VPH31 para transfección, el plásmido del VPH31 se digirió con EcoRI, se resolvió en gel de agarosa, la secuencia del VPH31 se purificó a partir de gel y se volvió a ligar. Los vectores de expresión para E1 y E2 del VPH18 se describen en [36]. El plásmido p994 de oriP del virus de Epstein Barr fue cedido amablemente por B. Sugden, descrito en [55]. La expresión del ARNhc estaba bajo el control del promotor U6 de la ARN polimerasa III.

Secuencia de ARNhc de Tdp1:
60 GCACGATCTCTGAAACAACTCGAGTTTGTTCAGAGAGATCGT (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de ARNhc de PARP1:
GGACTCGCTCCGGATGGCCTTCAAGAGAGGCCATCCGGAGCGAGTCC (SEQ ID NO: 2)

65 Exploración de alto rendimiento para la identificación de inhibidores del VPH18. El U2OS-GFP-Fluc n.º 10.15 se transfectó con 2 µg de minicírculo de VPH18-Rluc-E2 y las células se sembraron en placas de 100 mm. Al día

siguiente, las células se separaron y se sembraron en placas de 96 pocillos (5000 células por pocillo). 48 horas después de la transfección, los compuestos seleccionados se añadieron al medio en concentraciones de 5 μ M y 1 μ M. Las células se cultivaron durante tres días y se midieron tanto la luciferasa de luciérnaga (muestra viabilidad celular) como la luciferasa de *Renilla* (muestra el número de copias del VPH) usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega) según el protocolo del fabricante con el luminómetro GloMAX-96 (Promega). Los resultados se transfirieron a un diagrama de dispersión XY y se eligieron los aciertos específicos del VPH.

Productos químicos. El conjunto de diversidad IV y, adicionalmente, los compuestos NSC9782, NSC 88915, NSC 82269, NSC 109128 y NSC305831 se obtuvieron de Departamento de Química y Síntesis de Fármacos, Programa de Desarrollo Terapéutico, División de Tratamiento y Diagnóstico del Cáncer, Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. La camptotecina (CPT) (sc-200871) y ABT-888 (sc-202901) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology.

Ensayo de replicación. Las células U2OS o U2OS-EBNA1 se transfectaron con 2 μ g de genoma de minicírculo del VPH18 y 1 μ g de plásmido de oriP (solo en el caso de células U2OS-EBNA1). Todos los compuestos se añadieron al medio inmediatamente después de la transfección y el medio se cambió al tercer día. Las señales de replicación se detectaron con el método de transferencia de Southern. En resumen, el ADN genómico se extrajo 3 y 4 días después de la transfección con ARNhc o con el uso de ABT-888 y 5 días después para análisis de los efectos de los inhibidores del VPH con o sin CPT. El ADN se digirió con BglI y DpnI para análisis de la replicación del VPH18 y con BstXI, Scal y DpnI para análisis de replicación del VPH18 y oriP simultáneamente. Se resolvieron 3 μ g de ADN en gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nailon (Membrane Solutions LLC) y se hibridaron con sondas específicas marcadas con radiactividad. Las señales se detectaron y cuantificaron con lector de fósforo fotoestimulable Typhoon Trio+ (GE Healthcare) y se expusieron en una película de rayos X (AGFA).

Cuantificación del número de copias del VPH. Se usó PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para evaluar el efecto de los compuestos sobre la replicación del VPH11 y VPH5. Las células U2OS se transfectaron con 2 μ g del minicírculo del VPH11 o VPH5, los compuestos se añadieron al medio inmediatamente después de la transfección y de nuevo el 3^{er} día cuando se cambió el medio. El ADN genómico se extrajo 5 días después de la transfección, las muestras se linealizaron con HindIII (para el VPH11) y SacI (para el VPH5) y se digirieron con DpnI para fragmentar el ADN introducido. Para cada reacción de qPCR, se usaron 3 ng de ADN. Las reacciones se realizaron con EvaGreen qPCR Mix Rox (Solis BioDyne) según el protocolo del fabricante usando el sistema de PCR en tiempo real rápido 7900 HT (Applied Biosystems). Oligonucleótidos (300 nM de cada uno por reacción):

VPH11: 5'-AGCATGCAGACACATCAGGAATATTAG-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-GTGCCGATTGGGTGGTTGCAGGATTTG-3' (SEQ ID NO: 4);
VPH5: 5'-GGTTGCAGGAAGTGTGAGGT-3' (SEQ ID NO: 5) y 5'-TCCGCGACAGTCGGGGCACAGG-3' (SEQ ID NO: 6).

El Ct_{ADNr} se detectó como patrón de normalización a partir de la secuencia génica del ADN ribosómico en el genoma de U2OS con los siguientes oligonucleótidos (300 nM de cada uno):

5'-GCGGCGTTATTCCCATGACC-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'-GGTGCCCTTCCGTCAATTCC-3' (SEQ ID NO: 8).

El valor relativo C_N, que refleja el número promedio de copias del genoma vírico por célula, se calculó a partir de los datos con $\Delta Ct = Ct_{VPH} - Ct_{ADNr}$ y $C_N = 2^{-\Delta Ct}$.

Transferencia de Western. Las células se lisaron con tampón de Laemmli (SDS al 4 %, glicerol al 20 %, Tris-Cl 120 mM (pH 6,8) y DTT 200 mM) y se hirvieron durante 10 minutos a 100 °C. Las muestras se resolvieron en gel de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore). Se detectaron Tdp1 y PARP1 con sus anticuerpos específicos de Santa Cruz Biotechnology: sc-365674 y sc-56197 respectivamente. Se detectó tubulina (usada como control de carga) usando el anticuerpo de Sigma Aldrich T9026. Para la visualización se usaron el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa antirratón (LabAS) y el equipo de detección de transferencia de Western Amersham ECL (GE Healthcare). Las señales se expusieron en una película de rayos X (AGFA).

Cinco nuevos inhibidores del VPH identificados en la exploración de alto rendimiento del conjunto IV de diversidad del NCI.

El conjunto IV de diversidad del NCI se exploró como se ha descrito en el ejemplo 1 con el sistema modelo del VPH previamente caracterizado (solicitud provisional de los Estados Unidos 62/145 243 Secuencia de ARNhc de Tdp1: GCACGATCTCTCTGAAACAACTCGAGTTTGTTCAGAGAGATCGT (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de ARNhc de PARP1:

GGACTCGCTCCGGATGGCCTTCAAGAGAGGCCATCCGGAGCGAGTCC (SEQ ID NO: 2)

para compuestos que inhiben la amplificación inicial del genoma del VPH18 en células U2OS. La selección de HT se realizó con todos los compuestos de esta biblioteca en concentraciones de 5 μ M y 1 μ M y proporcionó 80 aciertos (aproximadamente el 5 % de los compuestos analizados). Después de la validación de los aciertos en el genoma ts del VPH18, se encontraron cinco compuestos que inhiben la amplificación inicial del VPH18 en células U2OS (figura 1). Para caracterizar adicionalmente los compuestos, se realizó el ensayo de replicación descrito en el ejemplo 1. La

inhibición relativa con respecto al control de vehículo DMSO se muestra en la figura 2, panel A. Los cinco compuestos: NSC 9782, NSC82269, NSC 88915, NSC 109128 y NSC 305831, muestran inhibición dependiente de la concentración de la amplificación inicial del VPH18, variando la CI50 entre 2,5 y 60 μ M.

Los inventores sentían curiosidad por saber si estos compuestos identificados podrían inhibir la replicación dependiente de E1 y E2 del plásmido que contiene el origen de replicación del VPH - URR. Transfectaron células U2OS con 25 ng de vectores de expresión de E1 y E2 junto con 500 ng del plásmido en minicírculo URR del VPH18 y añadieron diversas concentraciones de compuestos como se indica en la figura 2, panel B. Se detectó la replicación de URR del VPH18 mediante análisis de transferencia de Southern y ninguno de los compuestos inhibió la replicación de URR en comparación con el DMSO de control de vehículo (figura 2, panel B), lo que indica que se usan diferentes proteínas celulares para facilitar la replicación del genoma del VPH y/o la maquinaria de replicación del genoma vírico difiere de la replicación del plásmido URR. Otra posibilidad es la diferencia en los niveles de proteínas E1 y E2: el nivel de expresión durante la replicación del genoma del VPH es considerablemente menor que el nivel en el ensayo de replicación de URR.

Efecto de los compuestos sobre el mantenimiento estable y la amplificación vegetativa.

El sistema de los inventores basado en células U2OS es adecuado para estudiar las tres etapas de replicación de diversos subtipos de VPH. La fase de mantenimiento estable podría supervisarse manteniendo las células positivas para VPH en condiciones subconfluentes. Se usó la línea celular U2OS monoclonal positiva para VPH18 n.º 1.13 con un número de copias víricas ~2000. Se cultivaron las células n.º 1.13 en presencia de diversas concentraciones de compuestos en condiciones subconfluentes (las células se dividieron cada tres días) durante 7 días. La señal de replicación del VPH18 se detectó mediante análisis de transferencia de Southern y se cuantificó con un lector de fósforo fotoestimulable. Aproximadamente el 50 % de la señal se perdió en el caso del compuesto 82269 en comparación con el control de DMSO (figura 3, panel A, compárense los carriles 4-6 con el carril 15 y el panel B). Los compuestos 88915, 109128 y 305831 mostraron un efecto inhibitorio aún mayor: aproximadamente el 70 % de la señal se perdió durante el periodo de 7 días (figura 3, panel A, compárense los carriles 7-14 con el carril 15 y el panel B). En el caso del compuesto 9782, no se pudo detectar una reducción significativa de la señal (figura 3, panel A, carriles 1-3 y panel B). Por tanto, cuatro de los cinco compuestos identificados bloquearon eficazmente el mantenimiento estable de un tipo de VPH de alto riesgo.

Si el n.º 1.13 se cultiva en condiciones confluentes durante al menos 5 días, la amplificación vegetativa del genoma del VPH está activada. Se sembraron cantidades iguales de células en placas y se cultivaron durante 5 días sin dividir las. El 5º día se añadieron diversas concentraciones de compuesto y las células se cultivaron durante 7 días adicionales (el medio se cambió cada dos días a lo largo del experimento). La señal de replicación del VPH se detectó mediante análisis de transferencia de Southern y se cuantificó con un lector de fósforo fotoestimulable. Como puede verse en la figura 3, panel C carriles 16-18, se produce un aumento de aproximadamente 5-7 veces en el número de copias víricas semejante a la amplificación vegetativa. Los compuestos 109128 y 305831 anularon casi por completo la amplificación en concentraciones mayores (figura 3, panel C, carriles 10-15, panel D). El compuesto 82269 también mostró una clara inhibición dependiente de la concentración de la amplificación vegetativa (figura 3, panel C, carriles 4-6 y panel B). Sin embargo, los compuestos 9782 y 88915 no tuvieron ningún efecto (figura 3, panel C, carriles 1-3 y 7-9, panel D).

En conclusión, los compuestos 109128, 305831 y 82269 inhiben claramente tanto el mantenimiento estable como la amplificación vegetativa del VPH18, 88915 solo inhibe la fase de mantenimiento estable y 9782 no inhibe ninguna de las etapas de replicación posteriores.

La Tdp1 y PARP1 están implicados en la amplificación inicial del VPH18.

Se sabe que dos de los compuestos identificados, 88915 y 305831, inhiben la Tdp1. Para examinar si la Tdp1 es necesaria para la amplificación inicial de VPH18, se transfectaron células U2OS con el genoma de VPH18 junto con diversas concentraciones del plásmido de Tdp1 de ARNhc. Se utilizó un plásmido de ARNhc vacío como control simulado. En primer lugar, se evaluó la expresión de Tdp1 y la figura 4, el panel C muestra claramente que la expresión de la Tdp1 se reduce significativamente mediante el uso de shRNA_Tdp1. El siguiente ADN genómico se extrajo 3 y 4 días después de realizarse el ensayo de transfección y replicación. La figura 4, paneles A (compárense los carriles 1 y 2 con 3-8) y B muestran una clara disminución de la replicación del VPH18 cuando la expresión de la Tdp1 está regulada negativamente.

Recientemente se ha mostrado que la PARP1 activa la Tdp1 y la recluta en sitios de daño en el ADN. Para examinar si la PARP1 también está implicada en la replicación del VPH18, se transfectaron U2OS con el genoma del VPH18 junto con el plásmido shRNA_PARP1 o el vector de ARNhc vacío. La figura 4, panel F muestra que la expresión de PARP1 disminuye debido a la expresión de shRNA_PARP1. A continuación, se extrajo el ADN genómico 3 y 4 días después de la transfección y se realizó el ensayo de replicación para evaluar la amplificación inicial del VPH18. La figura 4, paneles D (compárense los carriles 1 y 2 con 3-6) y E muestran de hecho que la regulación negativa de PARP1 inhibe significativamente la replicación del VPH18.

La implicación de la PARP1 en la replicación del VPH18 también se evaluó usando el inhibidor de PARP1 conocido ABT-888 (veliparib). Las células U2OS se transfectaron con el genoma del VPH18 y se cultivaron en presencia de diversas concentraciones de ABT-888 durante 3 y 4 días, DMSO actúa como control de vehículo. Se realizó un ensayo de replicación y la figura 4, paneles G (compárense los carriles 1 y 2 con 3-10) y H muestran que la replicación del VPH18 se disminuye mediante el uso del inhibidor de PARP1 ABT-888.

En conclusión, los resultados demuestran que tanto Tdp1 como PARP1 son socios celulares importantes en la replicación del VPH18.

Efecto sinérgico de la camptotecina (CPT) e inhibidores de la replicación del VPH18. La CPT es un inhibidor de la topoisomerasa I que estabiliza los complejos Top1cc inmovilizados en el ADN. Ya que Tdp1 es responsable de escindir los complejos Top1cc inmovilizados del ADN, se produce un efecto sinérgico entre CPT y los inhibidores de Tdp1. En los experimentos mostrados en la figura 5 se usaron células U2OS que expresan de forma constitutiva la proteína EBNA1 del virus de Epstein Barr (EBV) - U2OS-EBNA1. Estas células permiten supervisar simultáneamente la replicación del plásmido de oriP compatible con EBNA1 y VPH. Durante la amplificación inicial del VPH, el genoma vírico se replica varias veces durante el ciclo celular, sin embargo, una vez por ciclo celular se produce replicación dependiente de EBNA1 debido a los mecanismos de control celular, lo que sugiere que el VPH y el VEB usan mecanismos de replicación completamente diferentes. Las células U2OS-EBNA1 se cotransfectaron con el genoma del VPH18 y el plásmido de oriP y las células se cultivaron en presencia de diversas concentraciones de los inhibidores del VPH identificados solos o junto con 2 nM de CPT durante 5 días, se usó DMSO como control de vehículo. Se realizó un ensayo de replicación, las señales se cuantificaron con lector de fósforo fotoestimulable y los resultados de la figura 5 muestran que todos los inhibidores del VPH son muy específicos porque ninguno de ellos inhibió la replicación dependiente de EBNA1 del plásmido de oriP. La CPT 2 nM sola no inhibió la amplificación inicial del VPH18. En el caso de los compuestos 109128 (figura 5, paneles C y D), 88915 (paneles E y F), 9782 (paneles G y H) y 305831 (paneles I y J), se produce un claro efecto sinérgico dependiente de la concentración junto con la CPT a medida que se inhibe la replicación del VPH de forma más eficaz (compárense los carriles 1-7 con 8-12 en todos los experimentos). El compuesto 82269 (figura 5, paneles A, compárense los carriles 1-7 con 8-12 y B), sin embargo, no mostró ningún efecto sinérgico junto con CPT.

Los compuestos no son inhibidores universales del VPH

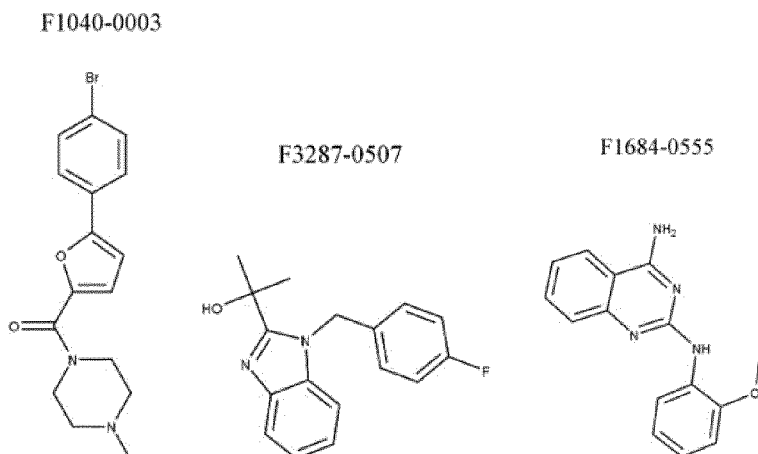
Para examinar si los compuestos identificados aquí también inhiben otros subtipos de VPH, las células U2OS se transfectaron con genomas de LR-VPH tipo 11 y VPH cutáneo tipo 5 y se cultivaron en presencia de diversas concentraciones de compuestos durante 5 días, los medios se cambiaron el 3^{er} día. Se añadió DMSO como control de vehículo. El ADN genómico se extrajo, el ADN del VPH se linealizó y se digirió con DpnI. Las señales de replicación del VPH se cuantificaron con análisis de qPCR como se describe en la sección de materiales y métodos. El resultado de la figura 6 muestra que ninguno de los compuestos inhibe la amplificación inicial del VPH5 (figura 6, panel A) o VPH 11 (figura 6, panel B). Sin embargo, los compuestos son activos contra VPH16 (figura 6, panel C), VPH33 (figura 6, panel D) y VPH31 (figura 6, panel E). Por consiguiente, parece que los compuestos inhiben la replicación del VPH de alto riesgo, incluyendo VPH 16, VPH 18, VPH31 y VPH33, pero no los tipos de VPH cutáneos y de bajo riesgo.

Los compuestos inhiben la replicación de HR-VPH a través de las proteínas de replicación E1 o E2 del VPH.

Además de las oncoproteínas E6 y E7, los VPH también se diferencian de las proteínas de replicación E1 y E2. Para determinar si los compuestos identificados aquí inhiben la replicación de HR pero no LR o VPH cutáneos a través de E1 o E2, El genoma mutante de HPV18E1E2 (deficiente en replicación debido a mutaciones en los ORF de E1 y E2) se replicó mediante proteínas E1 y E2 originadas a partir del VPH11. Se usó como control el genoma mutante de HPV18E1E2 solo. Las células U2OS se cotransfectaron con el genoma de minicirculo ts de VPH11 y mutante de HPV18E1E2 y las células se cultivaron en presencia del compuesto 305831 durante 5 días, los medios se cambiaron el 3^{er} día. Se añadió DMSO como control de vehículo. El ADN genómico se extrajo, el ADN del VPH se digirió con Agel, SdaI y DpnI. La replicación del VPH se detectó mediante análisis de transferencia de Southern. Los resultados de la figura 7 muestran, que el genoma mutante de HPV18E1E2 es de hecho deficiente en replicación cuando se transfecta solo (carril 7). El control de DMSO en la figura 7, carril 6 muestra que el genoma ts de VPH11 complementa con éxito el genoma del VPH18 deficiente en E1/E2. En el caso de muestras tratadas con el compuesto 305831, no hay inhibición de la replicación del VPH18 que es llevada a cabo por las proteínas E1 y E2 que se originan en el genoma del VPH11 (figura 7, compárense los carriles 1-6 con 7). Estos datos sugieren que los compuestos se dirigen a la proteína E1 o E2 de HR-VPH o su interacción con proteínas celulares. La actividad de las proteínas E1 y E2 de LR-VPH o su interactoma parecen ser diferentes en comparación con las proteínas de replicación de HR-VPH.

Compuestos potenciales adicionales para inhibir la replicación del VPH

En función de la estructura de los cinco compuestos identificados que son eficaces para inhibir una o más fases de la replicación del VPH, se han identificado las siguientes tres estructuras que tienen determinadas similitudes con los cinco compuestos identificados para compuestos potenciales para su uso en la inhibición de la replicación del VPH.



Según experimentos preliminares, estos compuestos parecen ser capaces de inhibir la fase de amplificación inicial del VPH 18.

Referencias:

1. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, *et al.* (2010). *Virology* 401: 70-79.
2. Humans IWGotEoCRt (2012) Biological agents. Volumen 100 B. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100: 1-441.
3. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L (2006) *Vaccine* 24 Supl 3: S3/1-10.
4. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, *et al.* (2003) *N Engl J Med* 348: 518-527.
5. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, *et al.* (2009) *Lancet Oncol* 10: 321-322.
6. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, *et al.* (2010) *E Int J Cancer* 127: 2893-2917.
7. Beutner KR, Ferenczy A (1997) *Am J Med* 102: 28-37.
8. Beutner KR, Tyring SK, Trofatter KF, Jr., Douglas JM, Jr., Spruance S, *et al.* (1998) *Antimicrob Agents Chemother* 42: 789-794.
9. Malik H, Khan FH, Ahsan H (2014) *Arch Virol* 159: 199-205.
10. Roman A, Munger K (2013) *Virology* 445: 138-168.
11. Vande Pol SB, Klingelutz AJ (2013) *Virology* 445: 115-137.
12. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, *et al.* (2012) *Vaccine* 30 Supl 5: F55-70.
13. Hong S, Laimins LA (2013). *Future Microbiol* 8: 1547-1557.
14. Hebner CM, Laimins LA (2006) *Rev Med Virol* 16: 83-97.
15. Hughes FJ, Romanos MA (1993) *Nucleic Acids Res* 21: 5817-5823.
16. Clower RV, Fisk JC, Melendy T (2006) *P. J Virol* 80: 1584-1587.
17. Loo YM, Melendy T (2004). *J Virol* 78: 1605-1615.
18. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA (1998) *J Virol* 72: 7407-7419.
19. Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013) The E1 proteins. *Virology* 445: 35-56.
20. McBride AA, Sakakibara N, Stepp WH, Jang MK (2012) *Biochim Biophys Acta* 1819: 820-825.
21. McBride AA (2013). *Virology* 445: 57-79.
22. Marechal A, Zou L (2013) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
23. Wang H, Zhang X, Teng L, Legerski RJ (2015) *D Exp Cell Res*.
24. Weitzman MD, Lilley CE, Chaurushiya MS (2010) *G Annu Rev Microbiol* 64: 61-81.
25. McFadden K, Luftig MA (2013) *Curr Top Microbiol Immunol* 371: 229-257.
26. Xiaofei E, Kowalik TF (2014) *Viruses* 6: 2155-2185.
27. Reinson T, Toots M, Kadaja M, Pipitch R, Allik M, *et al.* (2013) *E J Virol* 87: 951-964.
28. Moody CA, Laimins LA (2009) *PLoS Pathog* 5: e1000605.
29. Fradet-Turcotte A, Bergeron-Labrecque F, Moody CA, Lehoux M, Laimins LA, *et al.* (2011) *J Virol* 85: 8996-9012.
30. Gillespie KA, Mehta KP, Laimins LA, Moody CA (2012) *J Virol* 86: 9520-9526.
31. Sakakibara N, Mitra R, McBride AA (2011) *J Virol* 85: 8981-8995.
32. Anacker DC, Gautam D, Gillespie KA, Chappell WH, Moody CA (2014). *J Virol* 88: 8528-8544.
33. Mehta K, Gunasekharan V, Satsuka A, Laimins LA (2015) *PLoS Pathog* 11: e1004763.
34. Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, Ustav E, Ustav M (2009) *PLoS Pathog* 5: e1000397.
35. Kadaja M, Sumerina A, Verst T, Ojarand M, Ustav E, *et al.* (2007) *EMBO J* 26: 2180-2191.
36. Orav M, Henno L, Isok-Paas H, Geimanen J, Ustav M, *et al.* (2013) *J Virol* 87: 12051-12068.
37. Pommier Y (2013) *ACS Chem Biol* 8: 82-95.
38. Interthal H, Pouliot JJ, Champoux JJ (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12009-12014.
39. Murai J, Huang SY, Das BB, Dexheimer TS, Takeda S, *et al.* (2012) *T J Biol Chem* 287: 12848-12857.

40. Das BB, Antony S, Gupta S, Dexheimer TS, Redon CE, *et al.* (2009) EMBO J 28: 3667-3680.
 41. Interthal H, Chen HJ, Champoux JJ (2005) J Biol Chem 280: 36518-36528.
 42. Park SY, Cheng YC (2005) Cancer Res 65: 3894-3902.
 43. Malanga M, Althaus FR (2004) J Biol Chem 279: 5244-5248.
 5 44. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G (2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7: 517-528.
 45. Das BB, Huang SY, Murai J, Rehman I, Ame JC, *et al.* (2014) Nucleic Acids Res 42: 4435-4449.
 46. Pommier Y, Huang SY, Gao R, Das BB, Murai J, *et al.* (2014) DNA Repair (Amst) 19: 114-129.
 47. Huang SN, Pommier Y, Marchand C (2011) Expert Opin Ther Pat 21: 1285-1292.
 48. Geimanen J, Isok-Paas H, Pipitch R, Salk K, Laos T, *et al.* (2011) D J Virol 85: 3315-3329.
 10 49. Sankovski E, Mannik A, Geimanen J, Ustav E, Ustav M (2014) J Virol 88: 961-973.
 50. Toots M, Mannik A, Kivi G, Ustav M, Jr., Ustav E, *et al.* (2014) PLoS One 9: e116151.
 51. Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM (2011) C J Virol 85: 8080-8092.
 52. Chow LT, Nasser M, Wolinsky SM, Broker TR (1987) J Virol 61: 2581-2588.
 53. Isok-Paas H, Mannik A, Ustav E, Ustav M (2015) Virol J 12: 59.
 15 54. Kay MA, He CY, Chen ZY (2010) Nat Biotechnol 28: 1287-1289.
 55. Kirchmaier AL, Sugden B (1995) J Virol 69: 1280-1283.
 56. Antony S, Marchand C, Stephen AG, Thibaut L, Agama KK, *et al.* (2007) N Nucleic Acids Res 35: 4474-4484.
 57. Dexheimer TS, Gediya LK, Stephen AG, Weidlich I, Antony S, *et al.* (2009) J Med Chem 52: 7122-7131.
 58. Penning TD, Zhu GD, Gandhi VB, Gong J, Liu X, *et al.* (2009) J Med Chem 52: 514-523.
 20 59. Wahlberg E, Karlberg T, Kouznetsova E, Markova N, Macchiarulo A, *et al.* (2012) Nat Biotechnol 30: 283-288.
 60. Basu B, Sandhu SK, de Bono JS (2012) Drugs 72: 1579-1590.
 61. Chen A (2011) P Chin J Cancer 30: 463-471.
 62. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG (1998) Science 279: 1504-1513.
 63. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) C I. J Biol Chem 260: 14873-14878.
 25 64. Lepik D, Iives I, Kristjuhan A, Maimets T, Ustav M (1998) p J Virol 72: 6822-6831.
 65. Yates JL, Guan N (1991). J Virol 65: 483-488.
 66. Archambault J, Melendy T (2013). Antivir Ther 18: 271-283.
 67. Mayr LM, Bojanic D (2009) Curr Opin Pharmacol 9: 580-588.
 68. Fradet-Turcotte A, Morin G, Lehoux M, Bullock PA, Archambault J (2010) Virology 399: 65-76.
 30 69. Edwards TG, Vidmar TJ, Koeller K, Bashkin JK, Fisher C (2013) PLoS One 8: e75406.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Icosagen Cell Factory OU
 35 <120> Inhibidores de la replicación del virus del papiloma humano
 <130> PI100099PC
 40 <160> 8
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 45 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(46)
 55 <223> ARNhc de tdp1
 <400> 1
 gcacgatctc tctgaaacaa actcgagttt gtttcagaga gatcgt 46
 60 <210> 2
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

5	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(47) <223> ARNhc de PARP1	
10	<400> 2 ggactcgctc cggatggcct tcaagagagg ccatccggag cgagtcc	47
15	<210> 3 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintetizado químicamente	
25	<220> <221> misc_feature <223> cebador	
30	<400> 3 agcatgcaga cacatcagga atattag	27
35	<210> 4 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintetizado químicamente	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(27) <223> cebador	
50	<400> 4 gtgccgattg ggtggttgca ggatttg	27
55	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintetizado químicamente	
65	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20) <223> cebador	
	<400> 5 ggttgcagga actgtgaggt	20
	<210> 6 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintetizado químicamente	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(22)	

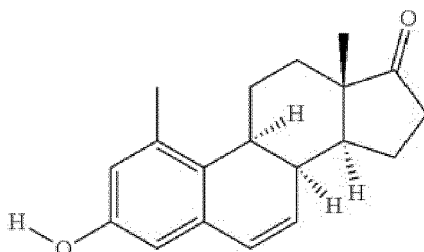
ES 2 901 978 T3

	<223> cebador	
5	<400> 6 tcgcgacag tcggggcaca gg	22
10	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintetizado químicamente	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20) <223> cebador	
20	<400> 7 gcggcggtat tccatgacc	20
25	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintetizado químicamente	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20) <223> cebador	
35	<400> 8 ggtgcccttc cgtcaattcc	20

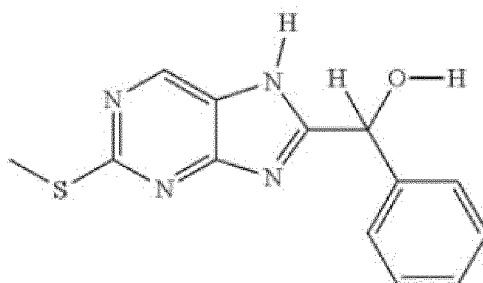
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto antivírico para su uso en la inhibición de una o más fases de replicación del virus del papiloma humano de alto riesgo, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en

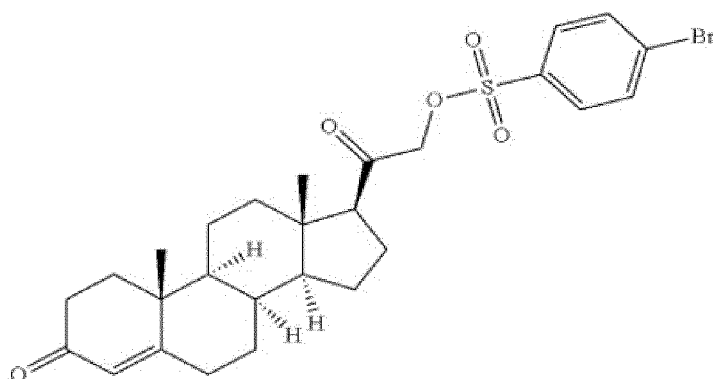
NSC 9782



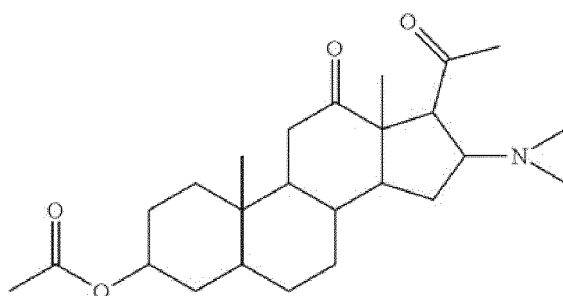
NSC 82269



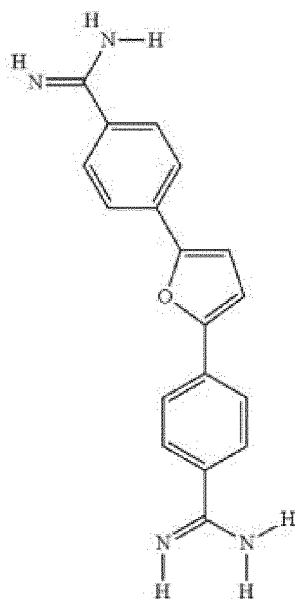
NSC 88915



NSC 109128



NSC 305831

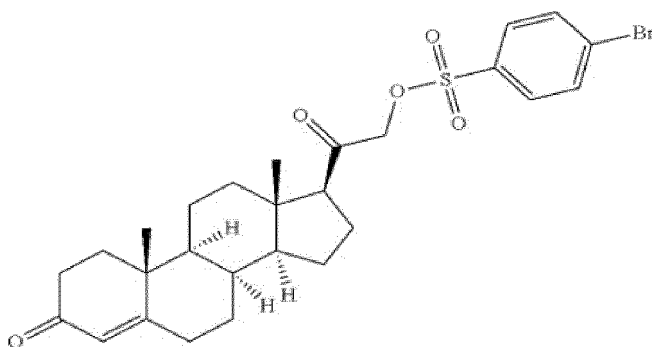


2. El compuesto antivirico para el uso de la reivindicación 1, en donde el VPH de alto riesgo es el VPH 16, VPH 18, VPH31, VPH33 o VPH45.

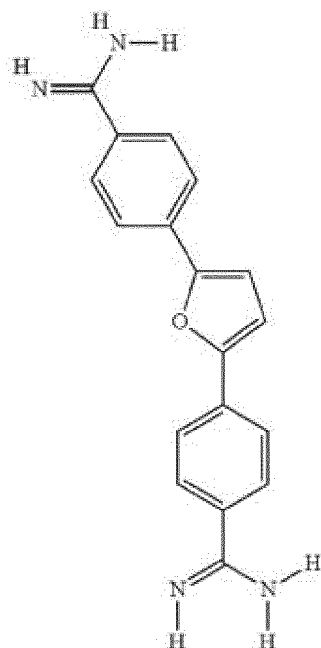
5 3. Un compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho tratamiento la administración o el contacto de células infectadas con dicho compuesto.

10 4. El compuesto para el uso de la reivindicación 3, en donde el compuesto es NSC88915 o NSC305831

NSC 88915



NSC 305831

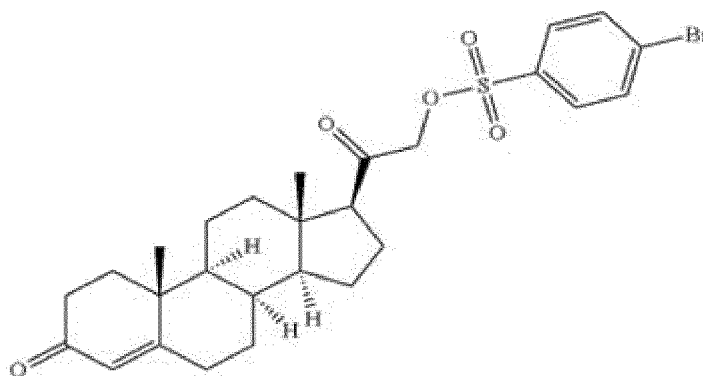


5. El compuesto para el uso de la reivindicación 3 o 4, en donde el VPH de alto riesgo es el VPH 16, VPH18, VPH31, VPH33 o VPH45.

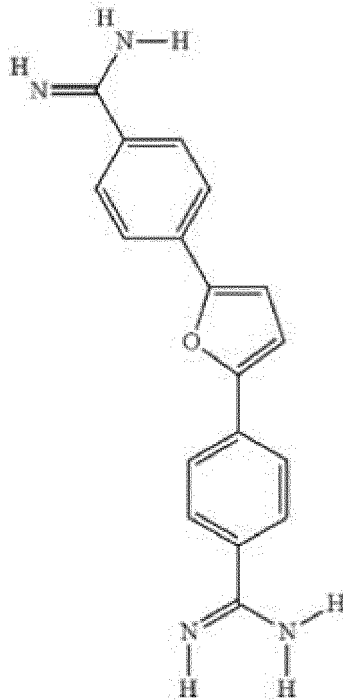
6. Un método para inhibir una o más fases de replicación del VPH de alto riesgo *in vitro*, comprendiendo dicho método una etapa de poner en contacto la célula infectada con un compuesto de la reivindicación 1.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el compuesto es NSC88915 o NSC305831:

NSC 88915



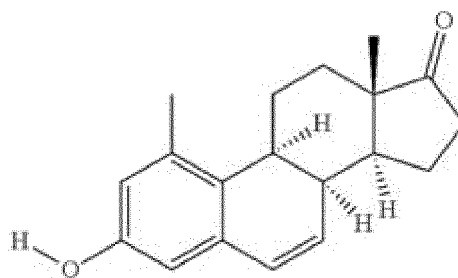
NSC 305831



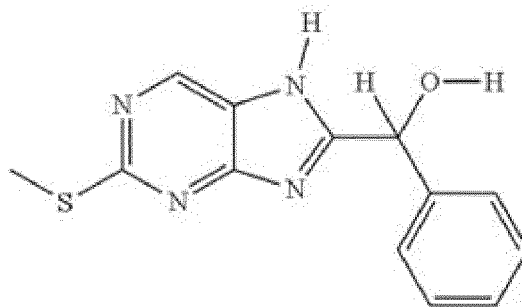
8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde el VPH es el VPH 16, VPH 18, VPH31, VPH33 o VPH45.

- 5 9. Un medicamento para su uso en el tratamiento de la infección por VPH de alto riesgo, comprendiendo dicho medicamento uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en:

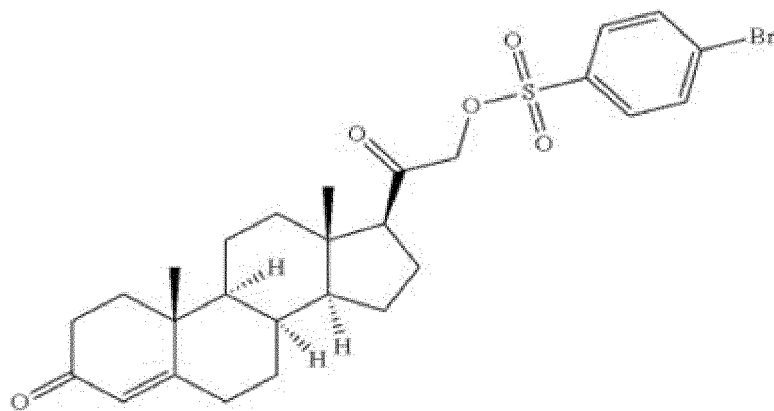
NSC 9782



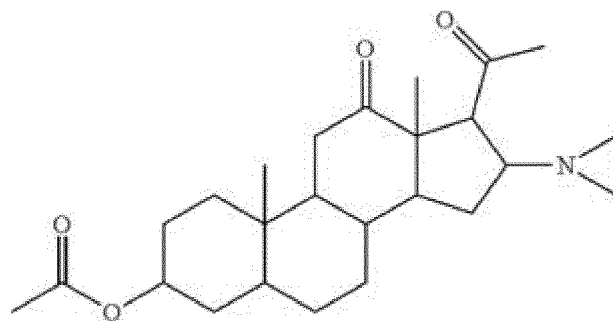
NSC 82269



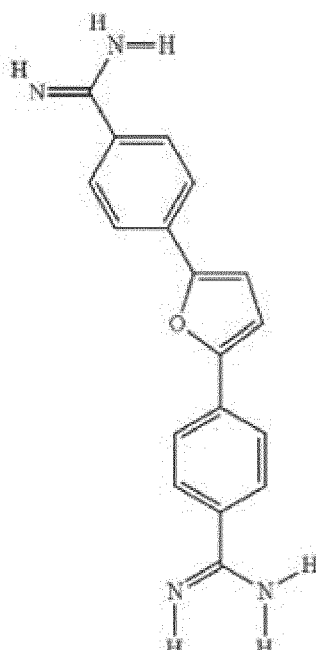
NSC 88915



NSC 109128



NSC 305831



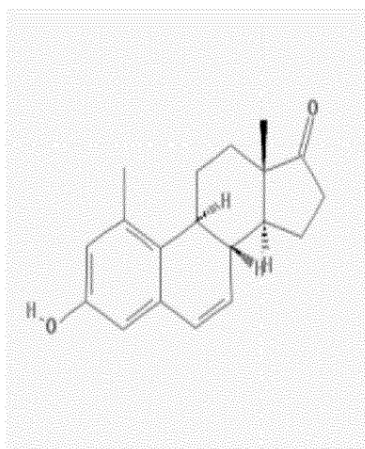
10. El medicamento para el uso de la reivindicación 9, en donde el compuesto es NSC88915 o NSC305831.

11. El medicamento para el uso de la reivindicación 9 o 10, en donde el medicamento comprende adicionalmente vehículos o adyuvantes.

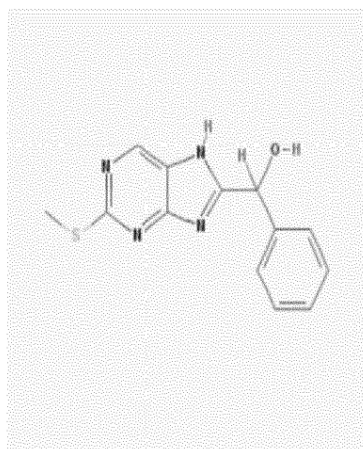
12. El medicamento para el uso de la reivindicación 10 u 11, en donde el medicamento es para tratar la infección por VPH 18 o VPH 16.

13. El medicamento para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde el medicamento está en forma de comprimido, inyección, crema, pomada o formulación líquida.

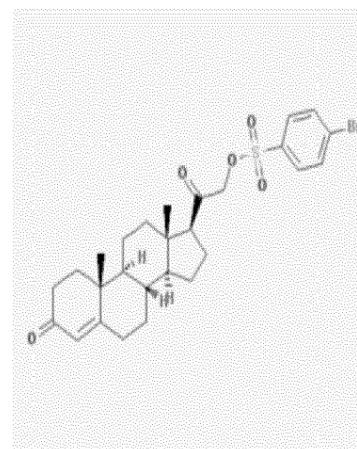
NSC 9782



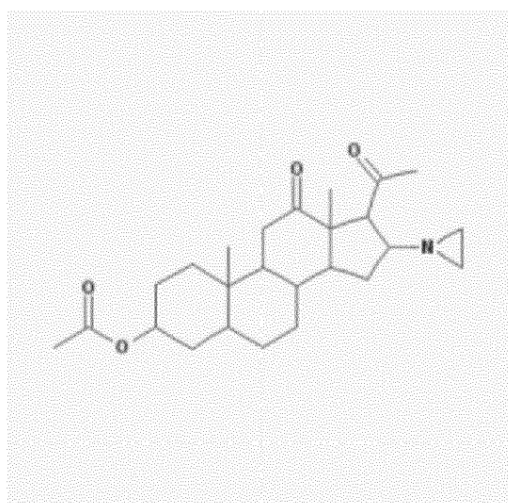
NSC 82269



NSC 88915



NSC 109128



NSC 305831

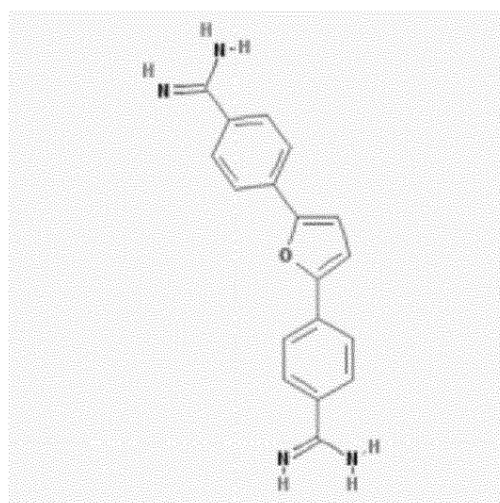


Figura 1

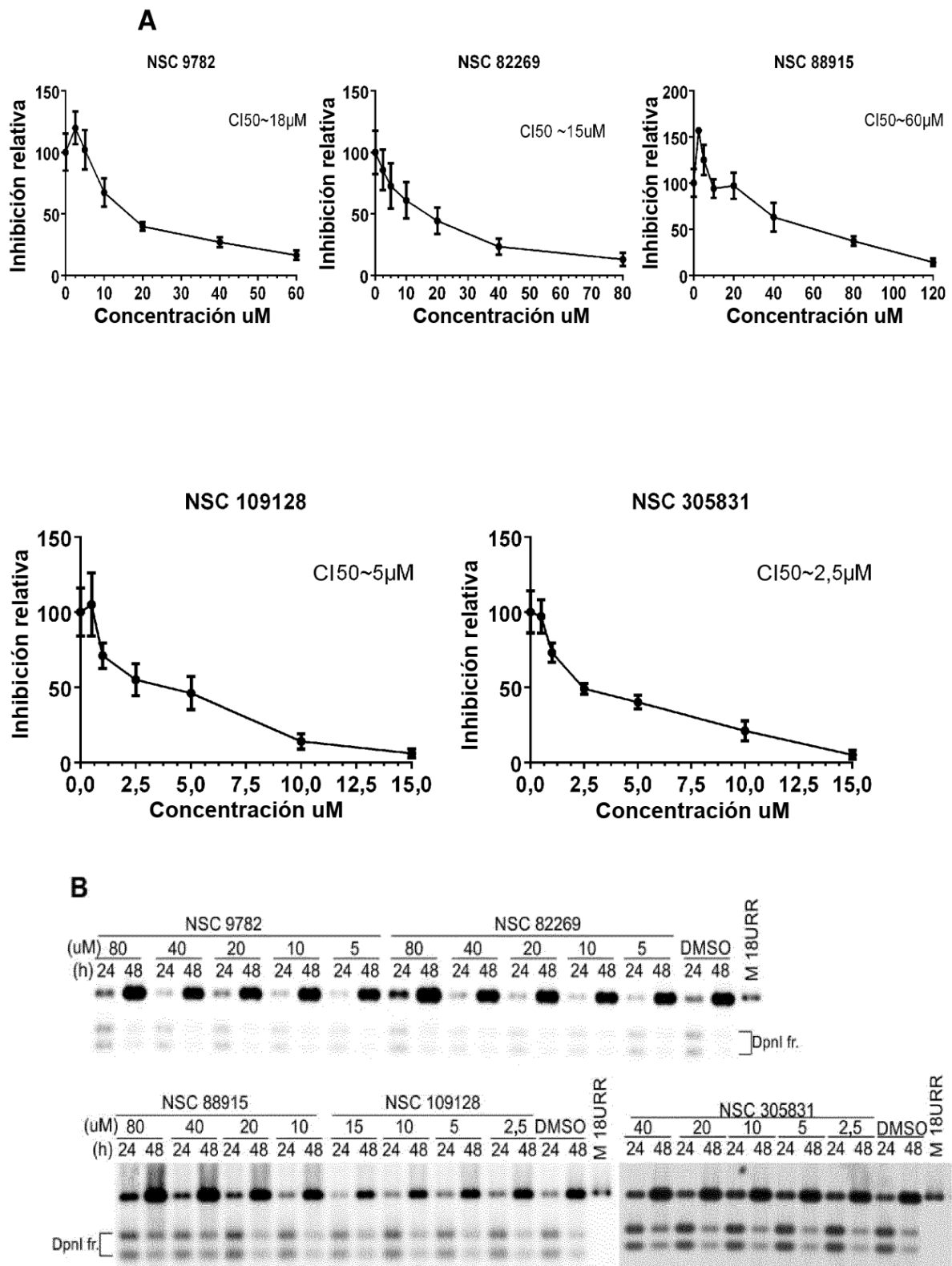


Figura 2

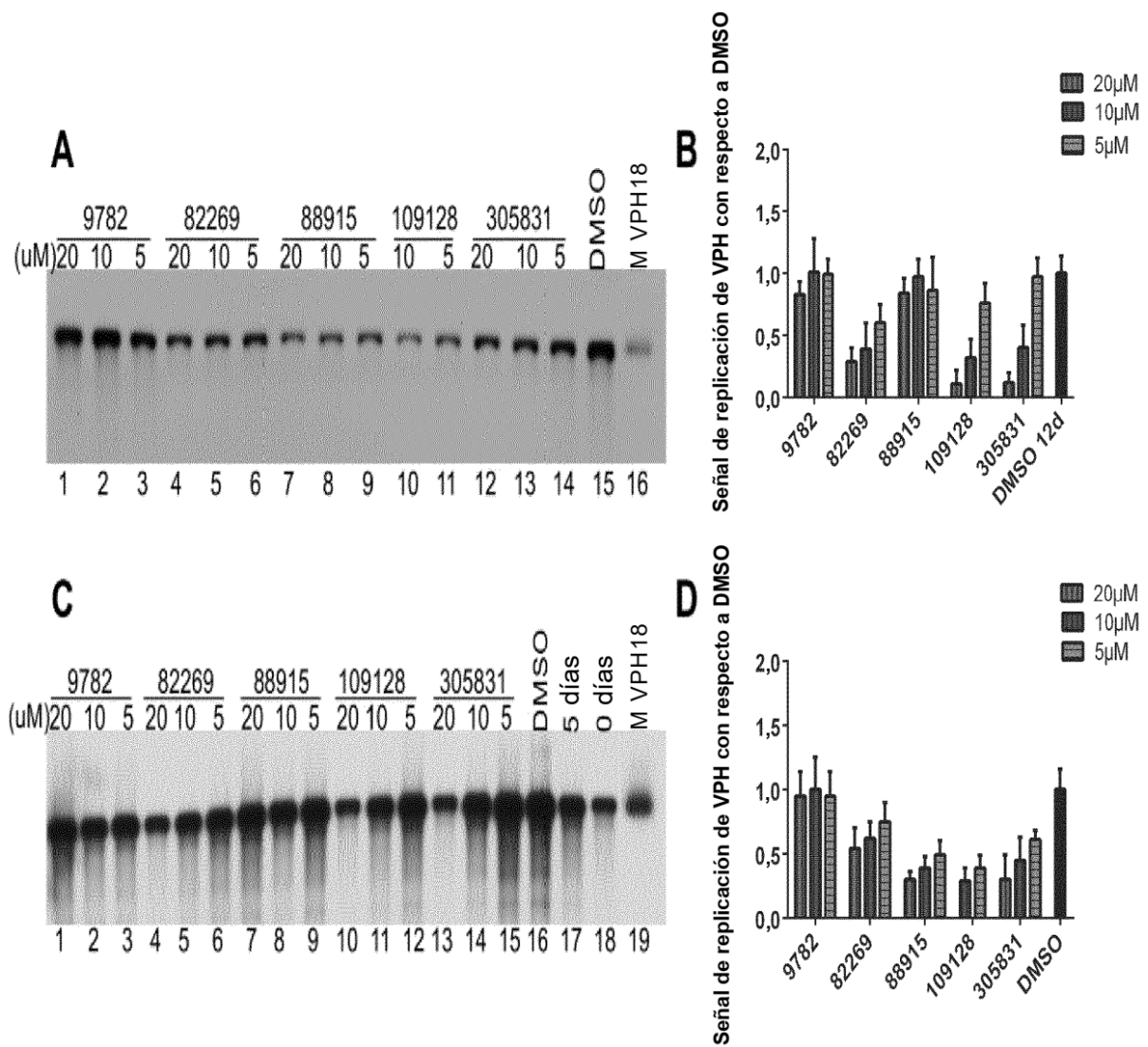
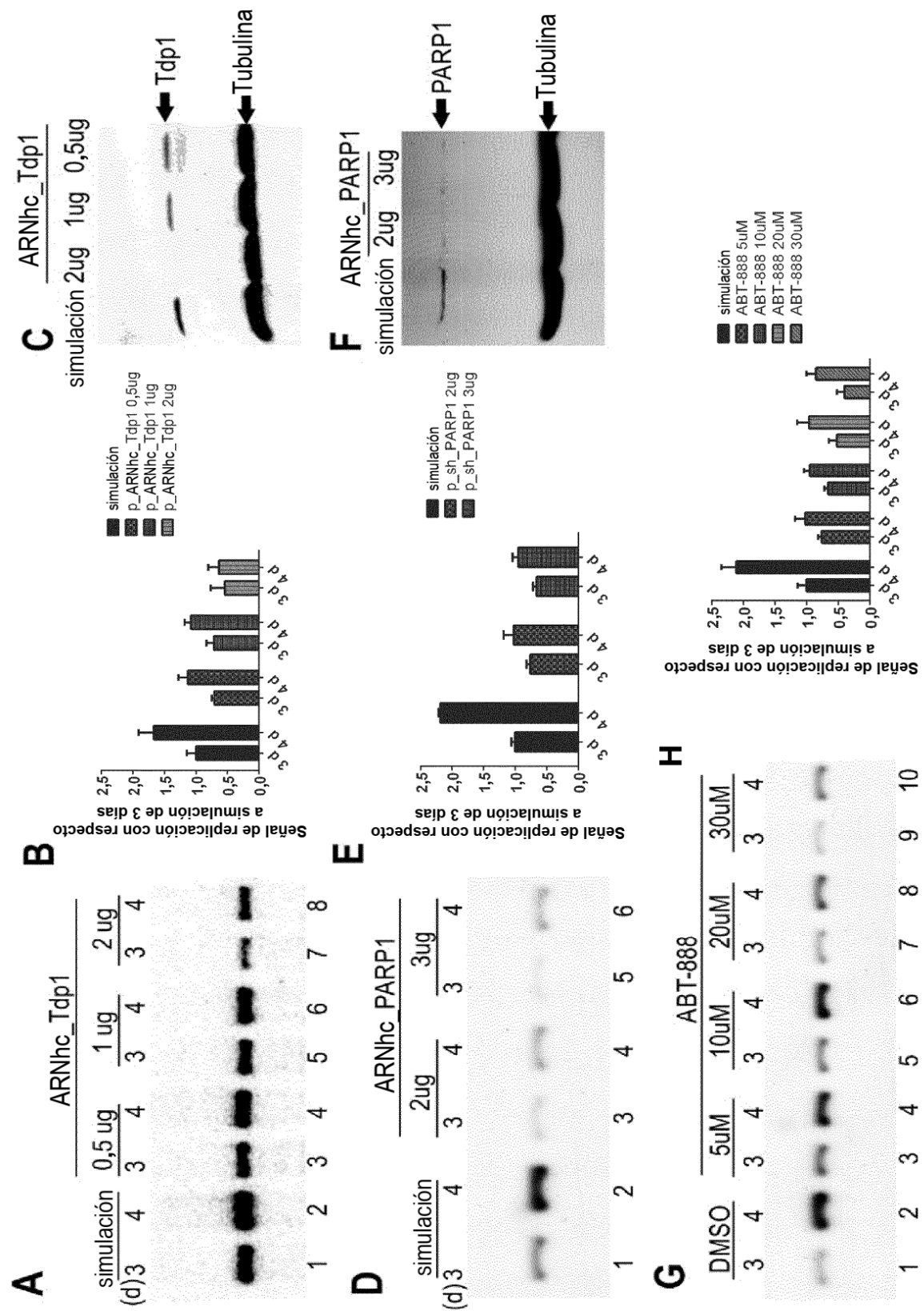


Figura 3



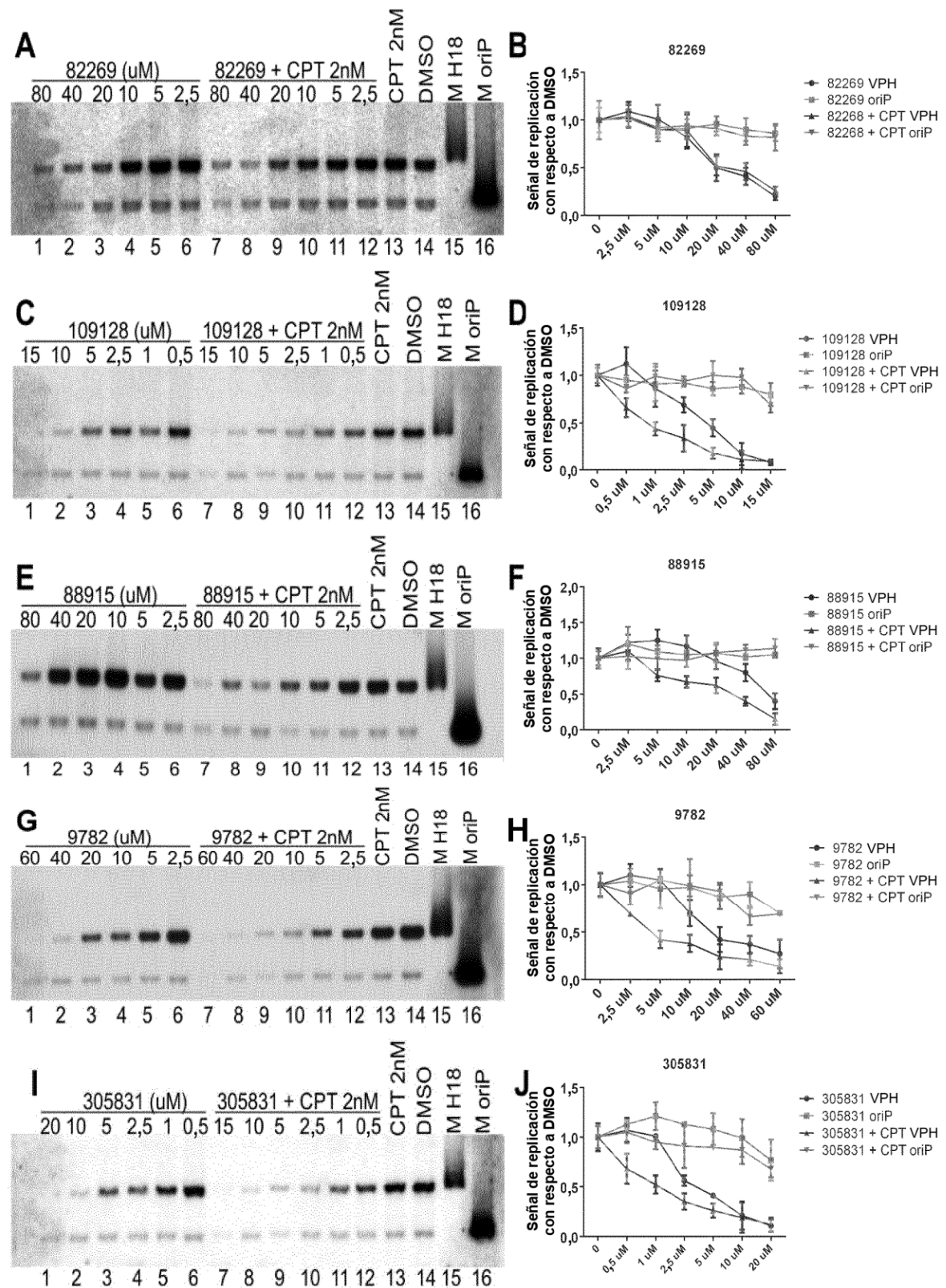


Figura 5

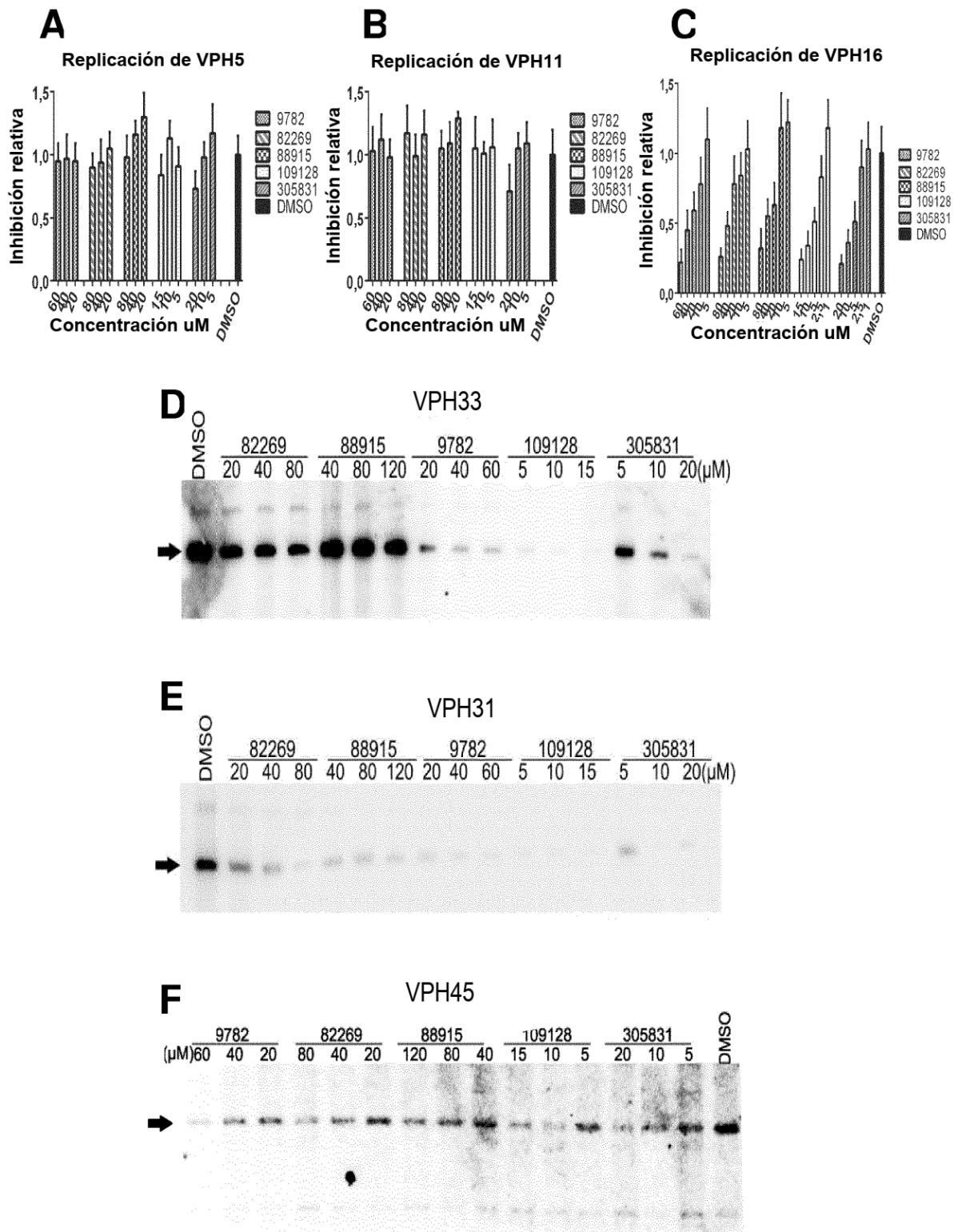


Figura 6