

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.10.02**

(30) Prioridade(s): **2002.10.03 US 415929 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.07.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.08.01**
203/2012

(73) Titular(es):

WYETH HOLDINGS CORPORATION
FIVE GIRALDA FARMS MADISON, NJ 07940 US

(72) Inventor(es):

LARRY SMITH US
MARIA CRISTINA CASSETTI US
JEFFREY K. PULLEN US
SUSAN P. MCELHINEY US

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS DE FUSÃO QUE COMPREENDEM OS POLIPÉPTIDOS E7 E E6 DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E AS COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DOS MESMOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO FORNECE COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS E FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO E A PREVENÇÃO DE CANCROS ASSOCIADOS AO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) E, EM PARTICULAR, DO CANCRO DO COLO DO ÚTERO. EM PARTICULAR, ESTA INVENÇÃO REFERE-SE A PROTEÍNAS DE FUSÃO, BEM COMO AOS ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM ESTAS PROTEÍNAS DE FUSÃO, UTILIZADAS PARA GERAR RESPOSTAS IMUNITÁRIAS CONTRA O HPV. ESPECIFICAMENTE, ESTA INVENÇÃO PERMITE FUSÕES DE HPV E6 E E7, EM QUE E6 E/OU E7 CONTÊM UMA OU MAIS MUTAÇÕES. ESTAS MUTAÇÕES ANULAM A ATIVIDADE DE TRANSFORMAÇÃO DESTAS PROTEÍNAS ONCOGÉNICAS E, DESTE MODO, CONFEREM SEGURANÇA ÀS FUSÕES E6/E7. ALÉM DISSO, ESTAS FUSÕES MANTÊM OU AUMENTAM A EFICÁCIA IMUNOGÉNICA DE E6 E E7. QUALQUER MÉTODO DE TRANSPORTE DE GENES OU PROTEÍNAS PODE SER UTILIZADO PARA ADMINISTRAR OU EMPACOTAR AS COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DA PRESENTE INVENÇÃO.

RESUMO**"PÉPTIDOS DE FUSÃO QUE COMPREENDEM OS POLIPÉPTIDOS E7 E E6
DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E AS COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS
DOS MESMOS"**

A presente invenção fornece composições imunogénicas e farmacêuticas para o tratamento e a prevenção de cancros associados ao vírus do papiloma humano (HPV) e, em particular, do cancro do colo do útero. Em particular, esta invenção refere-se a proteínas de fusão, bem como aos ácidos nucleicos que codificam estas proteínas de fusão, utilizadas para gerar respostas imunitárias contra o HPV. Especificamente, esta invenção permite fusões de HPV E6 e E7, em que E6 e/ou E7 contém uma ou mais mutações. Estas mutações anulam a atividade de transformação destas proteínas oncogénicas e, deste modo, conferem segurança às fusões E6/E7. Além disso, estas fusões mantêm ou aumentam a eficácia imunogénica de E6 e E7. Qualquer método de transporte de genes ou proteínas pode ser utilizado para administrar ou empacotar as composições imunogénicas da presente invenção.

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS DE FUSÃO QUE COMPREENDEM OS POLIPÉPTIDOS E7 E E6 DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E AS COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DOS MESMOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a composições farmacêuticas e imunogénicas utilizadas para tratar ou prevenir o cancro do colo do útero e outros cancros causados pelos vírus do papiloma humano (HPV). Em particular, esta invenção refere-se a proteínas de fusão, bem como aos ácidos nucleicos que codificam estas proteínas de fusão, utilizadas para gerar respostas imunitárias contra o HPV. Estas proteínas de fusão e polinucleótidos são utilizados no tratamento e na prevenção de cancros induzidos por HPV.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O cancro da cérvix uterina é a segunda causa principal de mortes relacionadas com tumores nas mulheres, representando 250.000 mortes por ano em todo o mundo. Mais de 99% de todos os cancros do colo do útero são conhecidos por estarem associados à infeção por vírus do papiloma humano (HPV), dos quais 50% estão diretamente ligados ao HPV tipo 16 (HPV16) (Walboomers *et al.*, *J. Path.* 1999, 189:12-19). Enquanto a maioria das infeções por HPV16 é sintomática e transitória, uma certa percentagem das mesmas torna-se persistente. Cerca de 1% dos indivíduos infetados de forma persistente desenvolvem lesões do colo do útero cada vez mais graves, conhecidas como neoplasia intraepitelial cervical (CIN), e eventualmente carcinoma cervical invasivo.

As proteínas HPV precoces conhecidas como E6 e E7 são necessárias para manter o fenótipo maligno (Von Knebel *et al.*, *Int J Cancer* 1992, 51:831-4; Crook *et al.*, *Embo J* 1989, 8:513-9; He e Huang, *Cancer Res.* 1997, 57:3993-9).

Estas proteínas são expressas consistentemente em lesões CIN e cânceros (Smotkin e Wettstein, *Proc Natl Acad Sci E.U.A.* 1986, 83:4680-4; Durst *et al.*, *Virology* 1992, 189:132-40). Estas proteínas induzem a proliferação do epitélio através da interrupção da regulação do ciclo celular. Especificamente, E7 liga e torna inativa a proteína de retinoblastoma (Rb) supressora de tumor celular (Dyson *et al.*, *Science* 1989, 243:934-7), o que resulta na progressão da célula para a fase S do ciclo celular (Cobrinik *et al.*, *Trends Biochem Sci* 1992, 17:312-5). A proteína E6 de HPV16 induz a degradação da proteína de supressão de tumor p53 (Scheffner *et al.*, *Cell* 1990, 63:1129-36), evitando que a célula passe pela apoptose.

Uma vez que as células tumorais expressam constitutivamente as proteínas E6 e E7, e estas proteínas não estão presentes nas células normais, estas proteínas virais são alvos muito atrativos para a terapêutica imunitária contra o cancro. Muitas linhas de evidência sugerem que uma resposta imunitária mediada por células contra E6 e E7 em seres humanos está correlacionada com a regressão natural das lesões HPV e a remoção de ADN viral (Nakagawa *et al.*, *J Infect Dis* 1997, 175:927-31; Kadish *et al.*, *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1285-93). Igualmente, uma resposta CTL contra E7 mostrou proteger os ratinhos contra tumores HPV16 positivos em modelos murinos diferentes (Feltkamp *et al.*, *Eur J Immunol* 1995, 25:2638-42; Lin *et al.*, *Cancer Res* 1996, 56:21-6).

Uma vez que a imunidade mediada por células (CMI) parece importante no controlo da doença e infeção por HPV (Eiben, G.L. *et al.*, *Adv Can Res* 2002, 86:113-148), uma vacina terapêutica deve gerar ótimas respostas de células T contra numerosos péptidos antigénicos E6 e E7 HPV para uma cobertura eficaz nas diversas populações de antígeno de leucócitos humanos (HLA).

Um vetor de vacinas promissor para o transporte de antígenos E6/E7 é um vetor alfavírus (AV) recombinante derivado da estirpe 3014 atenuada do vírus da encefalite equina venezuelana (VEE; Velders M.P. *et al.*, *Cancer Res* 2001, 61:7861-7867). As partículas de replicação VEE (VRP) de replicação incompetente provaram ser vacinas altamente eficazes em diversos modelos de tumor e doença infecciosa pré-clínicos (Rayner, J.O. *et al.*, *Rev Med Virol* 2002, 12:279-296). Os vetores de replicação derivados de AV, tais como VEE, codificam genes heterólogos na forma de ARN, não se espalham para além da infecção inicial, e induzem a apoptose de células infectadas (Griffith, D.E. *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.* 1997, 51:565-592). Estes atributos limitam as oportunidades para a integração ou expressão de proteínas prolongada no ADN do hospedeiro, que são características de malignidades induzidas por HPV a seguir à infecção natural. A baixa prevalência de imunidade anti-VEE preexistente e as possibilidades de imunização repetida com VRPs (Pushko, P. *et al.*, *Virology* 1997, 239:389-401) são vantagens relativamente a outros vetores virais recombinantes, tais como vírus *vaccinia* ou adenovírus.

Boursnell M. *et al.* (*Vaccine*, 1996, vol. 14, n.º 16, páginas 1485 a 1494) divulgam o vírus *vaccinia* recombinante que codifica proteínas de fusão E6-E7 HPV 16 e HPV 18 com mutações de aminoácido nos resíduos 24 e 26 de E7.

Borysiewicz LK *et al.* (*Lancet*, 1996, vol. 347, n.º 9014, páginas 1523 a 1527) divulgam, para utilização como imunoterapia para o cancro do colo do útero, o vírus *vaccinia* recombinante que codifica proteínas de fusão E6-E7 HPV 16 e HPV 18 com mutações de aminoácido nos resíduos 24 e 26 de E7.

O documento W099/10375 divulga uma vacina que compreende uma proteína de fusão E6-E7 HPV com mutações de aminoácido nos resíduos 24 e 26 de E7 ligada a um parceiro de fusão.

O documento US 6.004.557 divulga uma vacina que compreende uma proteína de fusão E6-E7 HPV16, em que cada, ou ambas, E7 e E6 podem ter uma mutação de deleção.

Dalal S *et al.* (*Journal of Virology*, 1996, vol. 70, n.º 2, páginas 683 a 688) divulgam HPV16 com mutações de aminoácido em vários resíduos, incluindo os resíduos 63 e 106 de E6.

Edmonds C *et al.* (*Journal of virology*, 1989, vol. 63, n.º 6, 1989, páginas 2650 a 2656) divulgam HPV 16 com mutações de aminoácido em vários resíduos, incluindo os resíduos 24, 26 e 91 de E7.

Velders MP *et al.* (*Cancer Research*, 2001, vol. 61, n.º 21, páginas 7861 a 867) divulgam a vacinação com o vetor da Encefalite Equina Venezuelana recombinante que codifica a proteína E7 HPV 16 (sem mutações).

Kast W *et al.* (*Journal of Immunology*, 1994, vol. 152, n.º 8, 1994, páginas 3904 a 3912) divulgam a afinidade de ligação de cinco alelos HLA-A de um conjunto de todos os péptidos nonómeros possíveis de proteínas E6 e E7 HPV 16 para selecionar candidatos à vacina.

Murakami M *et al.* (*Cancer Research*, 1999, vol. 59, n.º 6, páginas 1184 a 1187) divulgam a indução de respostas CTL a proteínas E6 e E7 HPV utilizando uma proteína de fusão E6-E7 recombinante (sem mutações) e células dendríticas humanas autólogas.

Offringa *et al.* (*Current Opinion in Immunology*, 2000, vol. 12, n.º 5, páginas 576 a 582) divulgam vacinas que compreendem proteínas E6 e E7 HPV que podem sofrer uma mutação para não terem capacidade transformadora, como parte de um artigo de revisão sobre as estratégias de vacina contra o cancro.

Embora sejam alvos atrativos para a terapêutica imunitária contra o cancro, E6 e E7 têm atividade transformadora. Consequentemente, os métodos de imunoterapia que utilizam E6 e E7 atualmente contemplados

na técnica são potencialmente perigosos, uma vez que estas proteínas podem induzir a transformação e imortalização de células.

Ainda persiste uma necessidade não satisfeita de composições eficazes para o tratamento e a prevenção de CIN e carcinoma do colo do útero. Mais especificamente, são necessárias composições imunogénicas, incluindo uma composição baseada em E6 e/ou B7, que sejam seguras e eficazes para o tratamento e/ou a prevenção de CIN, carcinoma cervical, carcinoma do ânus e outros distúrbios semelhantes.

Os estudos anteriores de composições imunogénicas HPV foram limitados pela falta de modelos de tumor de expressão de HLA de classe I em ratinhos. Um modelo E6/E7 HPV16 positivo é aqui descrito; este modelo forma tumores que crescem progressivamente em ratinhos transgénicos HLA-A*0201.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção satisfaz as necessidades descritas acima e outras ao fornecer composições farmacêuticas e polipéptidos que compreendem fusões de polipéptidos E6 e E7 que suportam mutações e uma ordem de fusão (E7E6) que diminui a atividade biológica e, por conseguinte, o potencial de atividade transformadora de E6 e E7.

Em particular, a presente invenção fornece novos polipéptidos de fusão E7E6 e os polinucleótidos que os codificam. Em formas de realização específicas, a invenção fornece polipéptidos que compreendem os polipéptidos E6 e E7 do vírus do papiloma humano, em que o polipéptido E7 tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 24, 26 e 91 da SEQ. ID N.º 14, e o polipéptido E6 tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 63 e 106 da SEQ. ID N.º 13. Numa forma de realização específica, o polipéptido de fusão compreende um polipéptido E7, no qual ambos os aminoácidos

correspondentes aos aminoácidos 24 e 26 da SEQ. ID N.º 14 sofrem uma mutação. Estes polipéptidos mutantes podem ter um resíduo de glicina em qualquer uma destas posições mutantes, e E6 é o carboxi-terminal para E7.

A presente invenção permite igualmente ácidos nucleicos isolados que codificam estes polipéptidos. Por exemplo, numa forma de realização da invenção o ácido nucleico isolado compreende as sequências E6 e E7 do vírus do papiloma humano, em que a sequência de nucleótidos E6 tem mutações em quaisquer nucleótidos correspondentes aos nucleótidos 187 a 189 e 316 a 318 do gene E6 HPV 16, e a sequência de nucleótidos E7 tem mutações em quaisquer nucleótidos correspondentes aos nucleótidos 70 a 72, 76 a 78 e 271 a 273 do gene E7 HPV 16, e em que a mutação ou as mutações resultam num aminoácido diferente que está a ser codificado. A presente invenção fornece igualmente composições farmacêuticas e imunogénicas que compreendem estes polipéptidos e polinucleótidos.

A presente invenção permite igualmente polipéptidos isolados com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ. ID N.º 9 ou na SEQ. ID N.º 11. Noutras formas de realização, a invenção fornece ácidos nucleicos isolados que codificam esses polipéptidos, incluindo ácidos nucleicos com a sequência de nucleótidos SEQ. ID N.º 10 ou SEQ. ID N.º 12.

Os vetores de expressão que compreendem as sequências de ácidos nucleicos que codificam fusões E7E6 também são fornecidos. Por exemplo, numa forma de realização específica, a invenção fornece vetores de expressão que compreendem a SEQ. ID N.º 10 ou 12 associada eficazmente a (por ex., sob o controlo de) uma sequência de controlo de expressão.

As células hospedeiras que compreendem ácidos nucleicos que codificam fusões E7E6 também são fornecidas,

bem como as células hospedeiras que expressam ou contêm os polipéptidos de fusão E7E6.

Ainda noutra forma de realização, a invenção fornece igualmente composições imunogénicas que compreendem um ácido nucleico ou polipéptido da invenção e são úteis, por ex., para o tratamento ou a prevenção do cancro do colo do útero. Essas composições imunogénicas podem compreender (a) um polipéptido da invenção (por ex., um polipéptido que compreende os polipéptidos E6 e E7 do vírus do papiloma humano, em que o polipéptido E7 tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 24, 26 e 91 da SEQ. ID N.º 14, e o polipéptido E6 tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 63 e 106 da SEQ. ID N.º 13), e (b) um portador farmacêuticamente aceitável. Como opção, uma composição imunogénica da invenção também pode conter um adjuvante.

Igualmente, são fornecidos vírus recombinantes que contêm um ou mais ácidos nucleicos da invenção, e/ou codificam um ou mais dos polipéptidos da invenção. Assim, por exemplo, um vírus recombinante da invenção compreende um ácido nucleico que codifica um polipéptido conforme apresentado na SEQ. ID N.º 9 ou 11 e, mais particularmente, com a sequência apresentada na SEQ. ID N.º 10 ou 12. Numa forma de realização particularmente preferida, um vírus recombinante da invenção é um vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) modificado.

Os métodos de utilização das composições mencionadas acima são fornecidos adicionalmente. Por conseguinte, é igualmente fornecido um método de produção de uma resposta imunitária num indivíduo, administrando-lhe quantidades imunologicamente eficazes de um polipéptido da invenção (por ex., um com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ. ID N.º 9 ou 11) e um portador farmacêuticamente eficaz.

Os métodos de tratamento e/ou prevenção do cancro do colo do útero são igualmente fornecidos. Por exemplo, métodos de tratamento do cancro do colo do útero em que é administrado a um paciente diagnosticado com cancro do colo do útero um polipéptido da invenção (por ex., um com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ. ID N.º 9 ou 11) e um portador farmacologicamente aceitável. Além disso, são fornecidos métodos de prevenção do cancro do colo do útero em que um polipéptido da invenção e um portador farmacologicamente aceitável são administrados a um indivíduo. A presente divulgação fornece métodos de tratamento e/ou prevenção do cancro do colo do útero num paciente, administrando-lhe uma quantidade imunologicamente eficaz de um ácido nucleico da invenção (por ex., um com uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um polipéptido com uma sequência de aminoácidos da SEQ. ID N.º 9 ou 11, particularmente apresentada na SEQ. ID N.º 10 ou 12).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As Figuras 1A e 1B são diagramas esquemáticos que mostram a localização das mutações de ponto introduzidas nas proteínas E6 e E7 HPV16 em relação aos epítomos putativos para os alelos HLA-A de Classe I maiores. A Figura 1A ilustra os aminoácidos que ocorrem naturalmente em B6, ⁶³C e ¹⁰⁶C que sofreram uma mutação para glicina. A Figura 1B ilustra os aminoácidos que ocorrem naturalmente em E7, ²⁴C, ²⁶E e ⁹¹C que sofreram uma mutação para glicina. Os epítomos de classe I definidos anteriormente capazes de ligar alelos HLA-A1, A2, A3, A11 e A24 são ilustrados em caixas pontilhadas (Kast, W.M. et al., *J Immunol* 1994, 152:3904-3912).

As Figuras 2A a E são esquemas que ilustram o alinhamento e a sequência de consenso das sequências de aminoácidos dos polipéptidos E6 dos vírus do papiloma humano 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68

(SEQ. ID N.ºs 15 a 26, respetivamente). A sequência de consenso (SEQ. ID N.º 39) é ilustrada por baixo do alinhamento. As letras maiúsculas na sequência de consenso indicam consenso completo, e as letras minúsculas na sequência de consenso indicam alta frequência, mas não consenso completo.

As Figuras 3A a C são esquemas que ilustram o alinhamento e a sequência de consenso das sequências de aminoácidos dos polipéptidos E7 dos vírus do papiloma humano 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (SEQ. ID N.ºs 27 a 38, respetivamente). A sequência de consenso (SEQ. ID N.º 40) é ilustrada por baixo do alinhamento. As letras maiúsculas na sequência de consenso indicam consenso completo, e as letras minúsculas na sequência de consenso indicam alta frequência, mas não consenso completo.

As Figuras 4A e 4B correspondem a gráficos que ilustram a percentagem de lise específica versus a relação efetor para célula-alvo (E:T), que representa respostas CTL a seguir à imunização VRP. Os ratinhos C57BL/6 foram imunizados subcutaneamente com 3×10^5 de IU da VRP indicada, e foram efetuados ensaios CTL 1 mês depois. A citotoxicidade foi medida através da libertação de Európio de células-alvo MC57G infetadas com E7-MVA (A) ou E6-MVA (B). Estes resultados foram reproduzidos em duas experiências adicionais (dados não ilustrados).

As Figuras 5A e 5B correspondem a gráficos que demonstram a percentagem de ratinhos sem tumor versus o número de dias após a indução do tumor. Os ratinhos C57BL/6 ($n = 8/\text{gp}$) foram preparados e reforçados com 3×10^5 de IU da composição imunogénica VRP indicada nos dias 21 e 7 e induzidos no dia 0 com 5×10^5 de células tumorais C3 (A) ou 5×10^4 de células tumorais TC-1 (B) no flanco. Os tumores foram monitorizados de 3 em 3 dias.

A Figura 6 corresponde a um gráfico que demonstra a percentagem de ratinhos sem tumor versus o número de dias após a indução do tumor. Os ratinhos C57BL16 (n = 8-16/gp) receberam 5×10^5 de células tumorais C3 no dia 0 e foram imunizados com a VRP indicada nos dias 7, 14 e 21. Os tumores foram monitorizados de 3 em 3 dias durante 45 dias.

A Figura 7 corresponde a um gráfico que demonstra a percentagem de ratinhos sem tumor versus o número de dias após a indução do tumor. Os ratinhos transgênicos HLA-A*0201 (n = 10/gp) receberam 2×10^6 de células tumorais HLF16 no dia 0 e foram imunizados com a VRP indicada nos dias 5, 10 e 15. Os tumores foram monitorizados de 5 em 5 dias.

As Figuras 8A e 8B correspondem a análises por *Western blot* que detetam a expressão de p53 (A) e Rb (B) nas células epiteliais mamárias (MECs) humanas primárias infectadas com preparados VRP diferentes. Vinte e quatro horas a seguir à infeção com a VRP indicada (numa MOI = 10); 25 ug de cada lisado de células MEC foram deitados em SDS-PAGE, transferidos eletroforeticamente (*blotted*) e sondados relativamente aos níveis de p53 (A) e Rb (B). O carregamento de proteína equivalente foi verificado através de sondagem com anticorpo antitubulina. A presença de proteínas E7 foi verificada através de sondagem das pistas indicadas com um anticorpo anti-E7.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção permite fusões de proteínas E6 e E7 HPV, as sequências de nucleótidos que codificam exemplos dessas fusões e formas mutantes das mesmas. Embora cada uma das mutações específicas de HPV16 aqui identificadas (com a exceção de E6 C106G, que apenas tinha sofrido anteriormente uma mutação para C106R (Dalal *et al.*, *J Virol* 1996, 70:683-8)) tenha sido divulgada anteriormente, não foram feitas combinações destas mutações nem foram testadas combinações destas mutações relativamente à respetiva aptidão de

conservar a imunogenicidade enquanto não existe capacidade transformadora ou de imortalização. Por exemplo, não era conhecido se quaisquer outras combinações de duas ou mais mutações resultariam em polipéptidos que mantinham a respetiva eficácia imunogénica. A presente invenção divulga fusões de proteínas E7E6 que contêm combinações únicas destas mutações e a descoberta surpreendente de que as proteínas de fusão E7E6 que contêm quatro ou cinco mutações definidas mantêm a respetiva eficácia imunogénica. Esta descoberta é particularmente importante, uma vez que uma composição imunogénica terapêutica deve gerar ótimas respostas celulares contra numerosos péptidos antigénicos E6 e E7 HPV para uma cobertura eficaz nas diversas populações HLA. A presente invenção divulga igualmente que estas fusões E7E6 que suportam múltiplas mutações, ao mesmo tempo que mantêm a respetiva eficácia imunológica, não mantêm as funções necessárias para a capacidade transformadora de E6 e E7, nomeadamente a degradação de p53 e pRB. Especificamente, as fusões da presente invenção não induzem a degradação de p53 ou Rb e, deste modo, são mais seguras do que os respetivos equivalentes não mutantes para a administração ou expressão num paciente.

A presente invenção divulga igualmente a descoberta surpreendente de que as fusões E7E6, ou seja, as fusões em que E6 é o carboxi-terminal para E7, aumentaram a atividade imunológica em comparação com os respetivos equivalentes E6E7.

Nos exemplos específicos, as proteínas de fusão E6E7 e E7E6 HPV16 foram produzidas e testadas relativamente à imunogenicidade e às respostas antitumorais. Diversas mutações de ponto foram introduzidas nos genes E6 e E7 para tornar inativo o respetivo potencial oncogénico, enquanto preservam os epítomos HLA conhecidos. As respostas CTL comparáveis ao epítopo E7₄₉₋₅₇ restrito a H-2D^b foram observadas entre os ratinhos imunizados com 3×10^5 de

unidades infecciosas de VPRs que codificam proteínas de fusão mutantes ou de tipo selvagem (wt). Todas as composições imunogênicas VRP de expressão de proteínas de fusão mutantes e de wt erradicaram os tumores C3 estabelecidos em 7 dias em 90% ou mais dos ratinhos. Além disso, as construções de fusão E6E7 demonstraram eficácia antitumoral em dois outros modelos de tumor E6E7 positivo. Especificamente, as VRPs E7E6 TetM conferiram uma rejeição de tumor completa no modelo de tumor HLF16. As células epiteliais mamárias humanas primárias infectadas com VRPs que expressam genes E6 e B7 mutantes, mas não de tipo selvagem, demonstraram níveis normais de proteínas p53 e retinoblastoma.

As fusões E7E6 da invenção

A presente invenção permite polipéptidos de fusão E7E6 que compreendem as múltiplas mutações C24G, E26G e C91G em E7 e C63G e C106G em E6 (consulte as Figuras 1A e B). Por exemplo, os polipéptidos de fusão E7E6TetM compreendem as mutações C24G e E26G E7 e as mutações C63G e C106G E6, enquanto os polipéptidos de fusão E7E6PentM compreendem a mutação C91G E7 além das quatro mutações presentes nos mutantes TetM. Estes polipéptidos de fusão mutantes, entre outros, podem ser instáveis. Os peritos na técnica reconhecem que as proteínas instáveis, em comparação com as proteínas estáveis, têm uma maior capacidade para desenvolver respostas CTL. Os peritos na técnica também irão reconhecer que as proteínas de fusão têm tendência para não se dobrar corretamente e, portanto, são menos estáveis do que os respectivos equivalentes não fundidos. Por conseguinte, as proteínas de fusão, tais como as divulgadas na presente invenção, são melhor adequadas para a produção de respostas imunitárias mediadas por células do que os respectivos equivalentes não fundidos.

As proteínas de fusão E6E7 e E7E6 HPV16 foram produzidas e testadas relativamente à imunogenicidade e às

respostas antitumorais. Diversas mutações de ponto foram introduzidas nos genes E6 e E7 para tornar inativo o respetivo potencial oncogénico, enquanto preservam os epítomos HLA conhecidos. Antes da presente invenção não era conhecido se as combinações das mutações aqui testadas iriam destruir a imunogenicidade dos polipéptidos, ou se esses polipéptidos mutantes iriam conservar a respetiva imunogenicidade. As respostas CTL comparáveis ao epítomo E7₄₉₋₅₇ restrito a H-2D^b foram observadas entre os ratinhos imunizados com 3×10^5 de unidades infecciosas de VPRs que codificam proteínas de fusão mutantes ou de tipo selvagem. Todas as composições imunogénicas VRP de expressão de proteínas de fusão mutantes e de tipo selvagem erradicaram os tumores C3 estabelecidos em 7 dias em 90% ou mais dos ratinhos. Além disso, as construções de fusão E6/E7 demonstraram eficácia antitumoral em dois outros modelos de tumor E6E7 positivo.

A presente invenção fornece polipéptidos de fusão que compreendem E6 e E7, em que E6 se encontra no carboxi-terminal. Os peritos na técnica irão reconhecer a partir da divulgação imediata que as fusões em que E6 é o carboxi-terminal para E7 (fusões E7E6), ou seja, E6 sucede a E7, tais como E7E6TetM e E7E6PentM, terão uma maior eficácia imunológica em comparação com as fusões em que E6 é o amino-terminal para E7 (fusões E6E7, tais como B6E7TetM e E6E7PentM). Além disso, será reconhecido pelos peritos na técnica que as fusões E7E6, ou seja, as fusões em que E6 é o carboxi-terminal para E7, terão uma menor atividade E6 em comparação com as fusões E6E7. Assim, de um modo geral, é esperado que as fusões E7E6 sejam mais seguras. Por conseguinte, as fusões em que E6 é o carboxi-terminal para E7 são uma forma de realização da presente invenção.

A presente invenção fornece exemplos de mutações específicas de aminoácidos e nucleótidos em posições correspondentes a C24, E26 e C91 de E7 HPV16 e a C63 e C106

de E6 HPV16 E6. Por exemplo, a presente invenção fornece cisteína 24 para sofrer uma mutação para glicina (a mutação correspondente na sequência de nucleótidos é CTG para CGG). Estes exemplos não são limitativos. Por exemplo, as mutações que resultaram igualmente na interrupção dos dedos de zinco ou da ligação de Rb podem ser utilizadas. Por exemplo, as mutações nos resíduos de cisteína importantes para a formação de dedos de zinco podem ser alteradas para qualquer outro aminoácido. As mutações preferidas resultam numa desestabilização da proteína e, como tal, num aumento da imunogenicidade da proteína.

Numa forma de realização específica da invenção, os polipéptidos são fusões de E6 e E7 HPV16 em que o polipéptido E7 tem mutações nos aminoácidos correspondentes às posições 24, 26 e 91 da SEQ. ID N.º 14, e o polipéptido E6 tem mutações num ou mais aminoácidos correspondentes às posições 63 e 106 da SEQ. ID N.º 13. Numa forma de realização preferida da invenção, os polipéptidos são fusões de E6 e E7 HPV 16 em que o polipéptido E7 tem mutações nos aminoácidos correspondentes às posições 24 e 26 da SEQ. ID N.º 14, e o polipéptido E6 tem mutações nos aminoácidos correspondentes às posições 63 e 106 da SEQ. ID N.º 13.

Na técnica, parte-se do princípio de que o número do aminoácido é determinado contando a metionina como o primeiro aminoácido, mesmo no caso em que a primeira metionina tenha sido eliminada na segunda das proteínas de fusão. Por exemplo, a mutação G24 de E6E7TetM (SEQ. ID N.º 3) é considerada como estando no resíduo 24 do polipéptido E7m.

Noutra forma de realização preferida da presente invenção, os polinucleótidos são fusões de polinucleótidos E6 e E7 HPV16, em que o polinucleótido E6 tem mutações em qualquer um dos nucleótidos 187 a 189 (que corresponde aos nucleótidos 290 a 292 do genoma HPV16 (número de acesso

GenBank K02718)) e 1316 a 318 (que corresponde aos nucleótidos 419 a 421 do genoma HPV16), e a sequência de nucleótidos E7 tem mutações em qualquer um dos nucleótidos 70 a 72 (que corresponde aos nucleótidos 631 a 633 do genoma HPV16), 76 a 78 (que corresponde aos nucleótidos 637 a 639 do genoma HPV1-6) e 271 a 273 (que corresponde aos nucleótidos 832 a 834 do genoma HPV16). Estas alterações de nucleótido resultam em mutações *missense*, não em mutações *nonsense*. Por outras palavras, estas mutações resultam num aminoácido diferente a ser codificado.

A presente invenção fornece polipéptidos e composições imunogénicas e farmacêuticas que compreendem estes polipéptidos, ou que compreendem nucleótidos que codificam estes polipéptidos. Conforme descrito abaixo, estes polipéptidos e polinucleótidos são descritos nas sequências aqui fornecidas. Por exemplo, o polipéptido E6E7TetM é descrito na SEQ. ID N.º 3. Os peritos na técnica irão reconhecer que as sequências de polipéptidos e polinucleótidos da presente divulgação não estão limitadas às sequências exatas divulgadas nesta aplicação. Por exemplo, as sequências E6 e E7 foram obtidas através da execução de PCR a partir do clone ATCC n.º 45113 de HPV16. As sequências E6 e E7 deste clone ATCC variam ligeiramente das existentes na sequência GenBank HPV16, K02718. Deste modo, os peritos na técnica irão reconhecer que a presente divulgação também compreende sequências de nucleótidos e aminoácidos substancialmente homólogas ou substancialmente semelhantes às aqui divulgadas e que a combinação de mutações descrita pode ocorrer no fundo de qualquer sequência E6 ou E7. Por exemplo, estas mutações e qualquer número de combinações destas mutações podem estar no contexto das sequências E6 e E7 divulgadas em K02718.

Os peritos na técnica irão reconhecer que a presente divulgação também pode ser direcionada para os outros membros da família do vírus do papiloma além do HPV16.

Outros genótipos do vírus do papiloma associados ao cancro, em particular, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 conservaram motivos nas respectivas proteínas E6 e E7 que são provavelmente centrais para a respetiva capacidade oncogénica (consulte *Fields Virology* Quarta Edição, 2001, caps. 65 e 66, págs. 2197 a 2265, Knipe & Howley Eds., Lippincott Williams and Wilkins). Em particular, estas proteínas E6 e E7 têm motivos de dedos de zinco C-X-X-C e, para E7, um motivo de ligação de Rb putativo L-X-C-X-E. Deste modo, uma forma de realização da presente divulgação compreende polinucleótidos e polipéptidos de fusão E6 e E7 de outros membros da família do vírus do papiloma, que têm mutações que correspondem às mutações divulgadas na presente invenção.

Os aminoácidos e os nucleótidos que correspondem às posições dos aminoácidos e nucleótidos específicos divulgados nas SEQ. ID N.ºs 1 a 12 podem ser determinados através da execução de um alinhamento de sequências. Os exemplos desses alinhamentos de sequências são ilustrados nas Figuras 2A a E e 3A a C. Nestas figuras, os aminoácidos dos polipéptidos E6 e E7 de HPVs 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 foram alinhados, e são apresentadas sequências de consenso. A sequência de aminoácidos de consenso E6 é representada na SEQ. ID N.º 39, e a sequência de aminoácidos de consenso E7 é representada na SEQ. ID N.º 40.

Estes alinhamentos demonstram que cada uma das mutações testadas na presente invenção é conservada em cada um destes vírus HPV e, por conseguinte, também pode sofrer uma mutação para eliminar o respetivo potencial oncogénico, ao mesmo tempo que mantém a sua aptidão para desencadear uma resposta imunitária. Os aminoácidos envolvidos na formação de estruturas, tais como motivos de dedos de zinco e ligação, são frequentemente conservados. É possível, por exemplo, identificar e causar uma mutação nos aminoácidos

ou nucleótidos conservados que correspondem aos aminoácidos 24, 26 e 91 de B7 HPV 16 e aos aminoácidos 63 ou 106 de E6 HPV16 em cada um dos membros dos genótipos HPV. Por exemplo, o alinhamento ilustrado nas Figuras 2A a E demonstra que o aminoácido E6 HPV18 que corresponde ao aminoácido 63 de E6 HPV16 (⁶³C) também é um resíduo de cisteína e que se encontra na posição 65 de E6 HPV18. Por conseguinte, ⁶⁶C de E6 HPV18, além de outros resíduos que correspondem aos aminoácidos 24, 26 e 91 de E7 HPV16 e ao aminoácido 106 de E6 HPV16, pode sofrer uma mutação na presente invenção. Igualmente, as mutações em qualquer polipéptido E6 HPV correspondente aos aminoácidos 65 ou 108 da sequência de consenso E6 (SEQ. ID N.º 39) ou em qualquer polipéptido E7 HPV correspondente aos aminoácidos 25, 27 ou 97 da sequência de consenso E7 (SEQ. ID N.º 40) podem ser criadas na presente invenção.

Numa forma de realização da presente invenção, os polipéptidos de fusão compreendem quatro destas mutações. Ainda noutra forma de realização, estes polipéptidos de fusão compreendem todas estas cinco mutações.

Definições de Biologia Molecular. De acordo com a presente invenção, podem ser utilizadas técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia e ADN recombinante na técnica. Essas técnicas são explicadas inteiramente na literatura. Consulte, por exemplo, Sambrook, Fitsch e Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (aqui designado por "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I e II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames e S.J. Higgins, eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. 1986); *immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B.E. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel

et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Os polinucleótidos aqui podem estar ladeados por sequências reguladoras naturais, ou podem estar associados a sequências heterólogas, incluindo promotores, intensificadores, elementos de resposta, sequências de sinal, sequências de poliadenilação, intrões, regiões 5' e 3' não codificadoras e afins. Os ácidos nucleicos também podem ser modificados através de muitos meios conhecidos na técnica. Os exemplos não limitativos dessas modificações incluem metilação, "coberturas", substituição de um ou mais dos nucleótidos que ocorrem naturalmente (ou seja, otimização do codão da terceira ou inicial base de "oscilação"), e modificações de internucleótidos, tais como, por exemplo, as que têm ligações não carregadas (por ex., metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) e as que têm ligações carregadas (por ex., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.). Os polinucleótidos podem conter uma ou mais partes adicionais ligadas de forma covalente, tais como proteínas (por ex., nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos de sinal, poli-L-lisina, etc.), intercaladores (por ex., acridina, psoraleno, etc.), quelatores (por ex., metais, metais radioativos, ferro, metais oxidantes, etc.) e alquilantes, entre outros. Os polinucleótidos podem ser derivatizados através da formação de uma ligação de fosforamidito de alquilo ou fosfotriéster de metilo ou etilo. Além disso, os polinucleótidos aqui também podem ser modificados com um rótulo capaz de fornecer um sinal detetável, quer direta quer indiretamente. Os rótulos exemplares incluem radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina e afins. Outros exemplos não limitativos de modificação possíveis são fornecidos abaixo na descrição da presente invenção.

O termo gene, também designado por "gene estrutural" significa uma sequência de ADN que codifica, ou corresponde

a, uma determinada sequência de aminoácidos que compreende toda ou parte de uma ou mais proteínas ou enzimas, e pode ou não incluir sequências de ADN reguladoras, tais como sequências de promotores, que determinam, por exemplo, as condições em que o gene é expresso. Alguns genes, que não são genes estruturais, podem ser transcritos de ADN para ARN, mas não são traduzidos para uma sequência de aminoácidos. Outros genes podem funcionar como reguladores de genes estruturais ou como reguladores de transcrição de ADN.

Uma “sequência de codificação” ou uma sequência “que codifica” um polipéptido, uma proteína ou enzima é uma sequência de nucleótidos que, quando expressa, resulta na produção desse polipéptido, dessa proteína ou enzima, ou seja, a sequência de nucleótidos codifica uma sequência de aminoácidos para esse polipéptido, essa proteína ou enzima. Preferencialmente, a sequência de codificação é uma sequência de ARN que é traduzida para um polipéptido numa célula *in vitro* ou *in vivo* quando colocada sob o controlo das sequências reguladoras apropriadas. Os limites da sequência de codificação são determinados por um codão de iniciação próximo do terminal 5' e um codão de terminação de tradução a jusante. Uma sequência de codificação pode incluir, mas não se limita a, sequências procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, sequências de ADN genómico de ADN eucariótico (por ex., mamífero) e até sequências de ADN sintético. Se a sequência de codificação se destinar à expressão numa célula eucariótica, um sinal de poliadenilação e uma sequência de terminação de transcrição encontrar-se-ão normalmente em 3' em relação à sequência de codificação.

As sequências de controlo de transcrição e tradução são sequências reguladoras de ADN, tais como promotores, intensificadores, terminadores, e afins, que permitem a expressão de uma sequência de codificação numa célula

hospedeira. Nas células eucarióticas, os sinais de poliadenilação são sequências de controlo. As “sequências de controlo de expressão” são as sequências de controlo de transcrição envolvidas na iniciação da transcrição, tais como promotores e intensificadores.

Uma “sequência de promotores” é uma região reguladora de ADN capaz de ligar a ARN polimerase numa célula e iniciar a transcrição de uma sequência de codificação a jusante (direção 3'). Para efeitos de definição desta invenção, a sequência de promotores é ligada no respetivo terminal 3' através do local de iniciação de transcrição e estende-se a montante (direção 5') para incluir o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar a transcrição em níveis detetáveis acima do fundo. Conforme descrito acima, o ADN de promotor é uma sequência de ADN que inicia, regula ou então media ou controla a expressão do ADN de codificação.

A amplificação de um polinucleótido, conforme aqui utilizado, denota a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para aumentar a concentração de uma determinada sequência de ADN numa mistura de sequências de ADN. Para obter uma descrição de PCR, consulte Saiki *et al.*, *Science* 1988, 239:487.

Os termos “expressar” e “expressão” significam permitir ou fazer com que as informações num gene ou numa sequência de ADN se tornem claras, por exemplo produzir uma proteína através da ativação das funções celulares envolvidas na transcrição e tradução de um gene ou sequência de ADN correspondente. Uma sequência de ADN é expressa numa, ou por uma, célula para formar um “produto de expressão”, tal como uma proteína. O próprio produto de expressão, por ex. a proteína resultante, também pode ser referido como sendo “expresso” pela célula. Um polinucleótido ou polipéptido é expresso de forma recombinante, por exemplo, quando é expresso ou produzido

numa célula hospedeira estranha sob o controlo de um promotor estranho ou nativo, ou numa célula hospedeira nativa sob o controlo de um promotor estranho.

O termo “transfeção” significa a introdução de um ácido nucleico estranho numa célula. O termo “transformação” significa a introdução de uma sequência de ARN, ADN ou gene “estranho” (ou seja, extrínseco ou extracelular) numa célula hospedeira, de modo a que a célula hospedeira expresse a sequência ou gene introduzido para produzir uma substância desejada, tipicamente uma proteína ou enzima codificada pela sequência ou gene introduzido. A sequência ou gene introduzido, que também pode ser designado por sequência ou gene “clonado” ou “estranho”, pode incluir sequências reguladoras ou de controlo, tais como de iniciação, terminação, promotores, sinais, secreção, ou outras sequências utilizadas pela maquinaria genética de uma célula. O gene ou sequência pode incluir sequências não funcionais ou sequências sem nenhuma função conhecida. Uma célula hospedeira que recebe e expressa ADN ou ARN introduzido foi “transformada” e é um “transformante” ou um “clone”. O ADN ou ARN introduzido numa célula hospedeira pode ser de qualquer origem, incluindo células do mesmo género ou espécie da célula hospedeira, ou células de um género ou espécie diferente.

Os termos “vetor” e “vetor de expressão” significam o veículo através do qual uma sequência de ADN ou ARN (por ex., um gene estranho) pode ser introduzida numa célula hospedeira, de modo a transformar o hospedeiro e a provocar a expressão de um polipéptido (por ex., transcrição e tradução) da sequência introduzida.

Normalmente, os vetores compreendem o ADN de um agente transmissível, no qual é inserido ADN estranho. Uma forma comum de inserir um segmento de ADN noutro segmento de ADN envolve a utilização de enzimas denominadas enzimas de restrição que dividem o ADN em locais específicos (grupos

específicos de nucleótidos) denominados locais de restrição. Em geral, o ADN estranho é inserido num ou em mais locais de restrição do ADN de vetor e depois é transportado pelo vetor para uma célula hospedeira juntamente com o ADN de vetor transmissível. Um segmento ou sequência de ADN com ADN inserido ou adicionado, tal como um vetor de expressão, também pode ser designado por "construção de ADN".

Um tipo comum de vetor é um "plasmídeo", que é geralmente uma molécula independente de ADN de filamento duplo. Um plasmídeo pode aceitar prontamente ADN (estranho) adicional e que pode ser prontamente introduzido numa célula hospedeira adequada. Um vetor plasmídeo contém frequentemente ADN de codificação e ADN de promotor, e tem um ou mais locais de restrição adequados para a inserção de ADN estranho. O ADN de promotor e o ADN de codificação podem ser do mesmo gene ou de genes diferentes, e podem ser dos mesmos ou de diferentes organismos. Diversos vetores, incluindo vetores plasmídeos e fúngicos, foram descritos para replicação e/ou expressão numa variedade de hospedeiros eucarióticos e procarióticos. Os exemplos não limitativos incluem plasmídeos pKK (Clontech), plasmídeos pUC, plasmídeos pET (Novagen, Inc., Madison, WI), plasmídeos pRSET ou pREP (Invitrogen, San Diego, CA) ou plasmídeos pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), e muitas células hospedeiras apropriadas, utilizando métodos aqui divulgados ou indicados, ou então conhecidos pelos peritos na técnica relevante. Os vetores de clonagem recombinantes incluirão frequentemente um ou mais sistemas de replicação para clonagem ou expressão, um ou mais marcadores para seleção no hospedeiro, por ex. resistência antibiótica, e uma ou mais cassetes de expressão. A experimentação habitual na biotecnologia pode ser utilizada para determinar os vetores de clonagem mais adequados para serem utilizados com a invenção. Em geral, a escolha do

vetor de clonagem depende do tamanho da sequência de polinucleótidos e das células hospedeiras a serem utilizadas.

Um “polipéptido” é uma cadeia de blocos de construção químicos chamados aminoácidos que são ligados uns aos outros por ligações químicas denominadas “ligações peptídicas”. O termo “proteína” refere-se a polipéptidos que contêm os resíduos de aminoácido codificados por um gene ou por uma molécula de ácido nucleico (por ex., um ARNm ou um ADNc) transcrita a partir desse gene direta ou indiretamente. Opcionalmente, uma proteína pode não ter determinados resíduos de aminoácido que são codificados por um gene ou por um ARNm. Uma proteína ou polipéptido, incluindo uma enzima, pode ser “nativo” ou de “tipo selvagem”, o que significa que ocorre na natureza; ou pode ser “mutante”, “variante” ou “modificado”, o que significa que foi criado, alterado, derivado ou é, de algum modo, diferente ou distinto de uma proteína nativa ou de outro mutante.

O termo “mutação” significa qualquer processo ou mecanismo que resulte numa proteína, enzima, polipéptido, polinucleótido, gene ou célula mutante. Isto inclui qualquer mutação em que uma sequência de proteínas, enzimas, polinucleótidos ou genes seja alterada, e qualquer alteração detetável numa célula resultante dessa mutação. A proteína, enzima, polipéptido e polinucleótido alterado é um “mutante”, designado igualmente por “variante”. Tipicamente, uma mutação ocorre numa sequência de polinucleótidos ou genes, através de mutações de ponto (substituições), deleções ou inserções de um único ou múltiplos resíduos de nucleótidos. Uma mutação inclui alterações de polinucleótido que surgem numa região de codificação de proteínas de um gene, bem como alterações em regiões fora de uma sequência de codificação de proteínas, tais como, mas não se limitando a, sequências reguladoras

ou de promotores. Uma mutação num gene pode ser “silenciosa”, ou seja, não se refletir numa alteração de aminoácidos na expressão, originando uma variante de “sequência conservadora” do gene. Geralmente, isto acontece quando um aminoácido corresponde a mais de um codão. A Tabela 1 indica que aminoácidos correspondem a que codões.

Deste modo, devido à degeneração do código genético, qualquer codão de três nucleótidos que codifique um resíduo de aminoácido mutante de um polipéptido de fusão E6/E7 aqui descrito faz parte do âmbito da invenção.

Os termos “mutante” e “variante” também podem ser utilizados para indicar uma célula, uma enzima, uma sequência de ADN ou ARN, um gene, etc., modificado ou alterado, ou seja, qualquer tipo de mutante. Essas alterações incluem igualmente alterações no promotor, local de ligação de ribossoma, etc.

O termo “variante de sequências de aminoácidos” refere-se a outros polipéptidos de fusão E6 e E7 adequados que podem ser diferentes dos polipéptidos de fusão E6 e E7 especificamente exemplificados através de modificações que não diminuem a imunogenicidade. Ao efetuar essas alterações, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A importância do índice hidropático de aminoácidos na atribuição da função biológica interativa num polipéptido é geralmente compreendida na técnica (Kyte e Doolittle, 1982). É sabido que determinados aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos com um resultado ou índice hidropático semelhante e ainda originarem um polipéptido com atividade biológica semelhante. Foi atribuído um índice hidropático a cada aminoácido com base nas respectivas características de hidrofobicidade e carga. Esses índices são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano

(-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); e arginina (-4,5).

Parte-se do princípio de que o caráter hidropático relativo do resíduo de aminoácido determina a estrutura secundária e terciária do polipéptido resultante, o que define consequentemente a interação do polipéptido com outras moléculas, tais como enzimas, substratos, recetores, anticorpos, antigénios, e afins. É sabido na técnica que um aminoácido pode ser substituído por outro aminoácido com um índice hidropático semelhante e ainda obter um polipéptido de funcionalidade equivalente. Nessas alterações, é preferida a substituição dos aminoácidos cujos índices hidropáticos se situam em ± 2 , é particularmente preferida a dos que se situam em ± 1 , e é ainda mais particularmente preferida a dos que se situam em $\pm 0,5$.

A substituição de aminoácidos iguais também pode ser efetuada com base na hidrofiliicidade, particularmente quando o péptido ou polipéptido biologicamente funcional equivalente assim criado se destina à utilização na forma de realização imunológica. A Patente U.S. n.º 4.554.101 especifica que a maior hidrofiliicidade média local de um polipéptido, conforme determinado pela hidrofiliicidade dos respetivos aminoácidos adjacentes, se correlaciona com a respetiva imunogenicidade e antigenicidade, ou seja, com uma propriedade biológica do polipéptido.

Conforme detalhado na Patente U.S. n.º 4.554.101, foram atribuídos os seguintes valores de hidrofiliicidade aos resíduos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1), glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina -(+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5 $\pm$ 1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4). É compreendido que

um aminoácido pode ser substituído por outro com um valor de hidrofiliicidade semelhante e ainda obter um polipéptido biologicamente equivalente e, em particular, imunologicamente equivalente. Nessas alterações, é preferida a substituição dos aminoácidos cujos valores de hidrofiliicidade se situam em ± 2 ; é particularmente preferida a dos que se situam em ± 1 ; e é ainda mais particularmente preferida a dos que se situam em $\pm 0,5$.

Conforme indicado acima, as substituições de aminoácido baseiam-se geralmente na semelhança relativa dos substituintes de cadeia lateral dos aminoácidos, por exemplo, a respetiva hidrofobicidade, a hidrofiliicidade, a carga, o tamanho e afins. As substituições exemplares que tomam em consideração várias das características anteriores são bem conhecidas dos peritos na técnica e incluem: arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

As “variantes de função conservadora” são proteínas ou enzimas nas quais um determinado resíduo de aminoácido foi alterado sem mudar a conformação estrutural global e a função especificada da proteína ou enzima. Isto inclui, mas sem limitação, a substituição de um aminoácido por um com propriedades físicas ou estruturais semelhantes, incluindo caráter polar ou não polar, tamanho, formato e carga (consulte, por ex., a Tabela 1).

TABELA 1

Aminoácidos, Codões Correspondentes e Funcionalidade/Propriedade			
Aminoácido	SLC	Codões de ADN	Propriedade de Cadeia Lateral
Isoleucina	I	ATT, ATC, ATA	Hidrofóbica
Leucina	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG	Hidrofóbica
Valina	V	GTT, GTC, GTA,	Hidrofóbica

		GTG	
Fenilalanina	F	TTT, TTC	Cadeia lateral aromática
Metionina	M	ATG	Grupo enxofre
Cisteína	C	TGT, TGC	Grupo enxofre
Alanina	A	GCT, GCC, GCA, GCG	Hidrofóbica
Glicina	G	GGT, GGC, GGA, GGG	Hidrofóbica
Prolina	P	CCT, CCC, CCA, CCG	Amina secundária
Treonina	T	ACT, ACC, ACA, ACG	Hidroxilo alifático
Serina	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	Hidroxilo alifático
Tirosina	T	TAT, TAC	Cadeia lateral aromática
Triptofano	W	TGG	Cadeia lateral aromática
Glutamina	Q	CAA, CAG	Grupo amida
Asparagina	N	AAT, AAC	Grupo amida
Histidina	H	CAT, CAC	Cadeia lateral básica
Ácido glutâmico	E	GAA, GAG	Cadeia lateral ácida
Ácido aspártico	D	GAT, GAC	Cadeia lateral ácida
Lisina	K	AAA, AAG	Cadeia lateral básica
Arginina	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Cadeia lateral básica
Codões de terminação	Terminação	TAA, TAG, TGA	-

Conforme aqui referido, “semelhança de sequência” significa até que ponto as sequências de nucleótidos ou

proteínas estão relacionadas. A extensão de semelhança entre duas sequências pode basear-se na percentagem de identidade e/ou conservação da sequência. Os aminoácidos para além dos indicados como conservados podem ser diferentes numa proteína ou enzima, de modo a que a percentagem de semelhança da sequência de proteínas ou aminoácidos entre quaisquer duas proteínas de função semelhante possa variar e possa ser, por exemplo, pelo menos de 70%, mais preferencialmente de 80%, e ainda mais preferencialmente, pelo menos, de 90%, conforme determinado de acordo com um esquema de alinhamento.

O termo "identidade de sequência" aqui significa até que ponto duas sequências de nucleótidos ou aminoácidos são invariantes.

Duas sequências de ADN são substancialmente homólogas ou substancialmente semelhantes quando, pelo menos, cerca de 80%, e mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 90 ou 95% dos nucleótidos correspondem ao comprimento definido das sequências de ADN, conforme determinado pelos algoritmos de comparação de sequências, tais como BLAST, FASTA, DNA Strider, etc. Um exemplo de uma sequência dessas é uma variante alélica ou de espécie dos genes específicos da invenção. As sequências que são substancialmente homólogas podem ser identificadas através da comparação das sequências utilizando software padrão disponível nos bancos de dados de sequências, ou numa experiência de hibridação *Southern* em, por exemplo, condições restritivas, conforme definido para esse sistema específico.

Igualmente, duas sequências de aminoácidos são substancialmente homólogas ou substancialmente semelhantes quando mais de 80% dos aminoácidos forem idênticos, ou mais de 90% forem semelhantes. De preferência, as sequências semelhantes ou homólogas são identificadas através do alinhamento de sequências.

As variantes de sequência conservadora de uma sequência de polinucleótidos são aquelas em que uma alteração de um ou mais nucleótidos num determinado codão não resulta em nenhuma alteração no aminoácido codificado por esse codão.

O termo "alinhamento de sequências" significa o processo de organização em fila de duas ou mais sequências para atingir os níveis máximos de identidade de sequências (e, no caso de sequências de aminoácidos, a conservação), por ex., para efeitos de avaliação do grau de semelhança das sequências. Diversos métodos de alinhamento de sequências e avaliação da semelhança e/ou identidade são conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, o Método de Agrupamento (Cluster), em que a semelhança se baseia no algoritmo MEGALIGN, bem como BLASTN, BLASTP e FASTA (Lipman e Pearson, 1985; Pearson e Lipman, 1988). Ao utilizar todos estes programas, as definições preferidas são as que resultam na maior semelhança de sequências.

O termo "heterólogo" refere-se a uma combinação de elementos que não ocorre naturalmente. Por exemplo, o ADN heterólogo refere-se a ADN que não se encontra naturalmente na célula nem num local cromossómico da célula. Preferencialmente, o ADN heterólogo inclui um gene estranho para a célula. Um elemento regulador de expressão heterólogo é um elemento regulador associado eficazmente a um gene diferente do gene ao qual está associado eficazmente na natureza.

As modificações, que não alteram normalmente a sequência primária dos polipéptidos de fusão E6 e E7, incluem a derivatização química *in vivo* ou *in vitro* dos polipéptidos, por ex., acetilação, metilação ou carboxilação. Igualmente incluídos como polipéptidos variantes desta invenção estão os polipéptidos modificados por glicosilação, por ex., os criados através da modificação dos padrões de glicosilação de um polipéptido

durante a respetiva síntese e processamento ou noutras etapas de processamento; ou através da exposição do polipéptido a enzimas que afetam a glicosilação, tais como enzimas glicosiladas ou deglicosiladas de mamíferos. Igualmente abrangidos como polipéptidos variantes estão as sequências que sofreram uma mutagénese identificadas acima, que têm resíduos de aminoácidos fosforilados, por ex., fosfotirosina, fosfoserina ou fosfotreonina.

O termo "célula hospedeira" significa qualquer célula de qualquer organismo que é selecionado, modificado, transformado, desenvolvido, ou utilizado ou manipulado de alguma forma, para a produção de uma substância através da célula, por exemplo a expressão através da célula de um gene, uma sequência de ADN ou ARN, uma proteína ou uma enzima.

Conforme aqui utilizado, o termo isolado significa que o material referenciado é removido do ambiente no qual se encontra normalmente. Deste modo, um material biológico isolado pode não ter componentes celulares, ou seja, componentes das células nos quais o material se encontra ou é produzido. No caso de moléculas de ácido nucleico, um ácido nucleico isolado inclui um produto PCR, um ARNm isolado, um ADNc ou um fragmento de restrição. Noutra forma de realização, um ácido nucleico isolado é preferencialmente extraído do cromossoma no qual possa encontrar-se e, mais preferencialmente, nunca mais é associado a regiões não reguladoras e não codificadoras, nem a outros genes, localizados a montante ou a jusante do gene incluído na molécula de ácido nucleico isolado quando encontrado no cromossoma. Ainda noutra forma de realização, o ácido nucleico isolado não tem um ou mais intrões. As moléculas de ácido nucleico isolado incluem sequências inseridas em plasmídeos, cosmídeos, cromossomas artificiais e afins. Deste modo, numa forma de realização específica, um ácido nucleico recombinante é um ácido nucleico isolado.

Uma proteína isolada pode ser associada a outras proteínas ou ácidos nucleicos, ou ambos, aos quais se associa na célula, ou a membranas celulares se for uma proteína associada a membranas. Um tecido, célula ou organelo isolado é removido do local anatómico no qual se encontra num organismo. Um material isolado pode ser, mas não necessita de ser, purificado.

O termo "purificado" conforme aqui utilizado refere-se a material que foi isolado em condições que reduzem ou eliminam a presença de materiais não relacionados, ou seja, contaminantes, incluindo materiais nativos a partir dos quais o material é obtido. Por exemplo, uma proteína purificada é, de preferência, substancialmente livre de outras proteínas ou ácidos nucleicos aos quais está associada numa célula; uma molécula de ácido nucleico purificado é, de preferência, substancialmente livre de proteínas ou outras moléculas de ácido nucleico isolado com as quais pode ser encontrada numa célula. Conforme aqui utilizado, o termo "substancialmente livre" é utilizado de modo operacional, no contexto dos testes analíticos do material. Preferencialmente, o material purificado substancialmente livre de contaminantes é, pelo menos, 50% puro; mais preferencialmente, pelo menos, 90% puro e ainda mais preferencialmente, pelo menos, 99% puro. A pureza pode ser avaliada através de cromatografia, eletroforese em gel, imunoensaio, análise de composição, ensaio biológico, e outros métodos conhecidos na técnica.

Os métodos de purificação são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, os ácidos nucleicos podem ser purificados através de precipitação, cromatografia (incluindo cromatografia em fase sólida preparatória, hibridação de oligonucleótidos, e cromatografia de hélice tripla), ultracentrifugação e outros meios. Os polipéptidos e as proteínas podem ser purificados através de vários métodos, incluindo, sem limitação, eletroforese em disco-

gel preparatória, focalização isoeletrica, HPLC, HPLC em fase reversa, filtração em gel, cromatografia de partição e troca de iões, cromatografia de precipitação e precipitação por salificação, extração e distribuição em contracorrente. Para alguns fins, é preferível produzir o polipéptido num sistema recombinante no qual a proteína contenha uma cauda (*tag*) de sequência adicional que facilite a purificação, tal como, mas sem limitação, uma sequência de polihistidinas, ou uma sequência que ligue especificamente a um anticorpo, tal como FLAG e GST. Em seguida, o polipéptido pode ser purificado a partir de um lisado de produto bruto da célula hospedeira através de cromatografia numa matriz de fase sólida apropriada. Em alternativa, os anticorpos produzidos contra a proteína ou contra os péptidos derivados daí podem ser utilizados como reagentes de purificação. As células podem ser purificadas através de várias técnicas, incluindo centrifugação, separação de matriz (por ex., separação de fio de nylon), decantação e outras técnicas de imunosseleção, depleção (por ex., depleção de complemento de células contaminantes) e separação de células (por ex., separação de células ativadas por fluorescência [FACS]). São possíveis outros métodos de purificação. Um material purificado pode conter menos de cerca de 50%, preferencialmente menos de cerca de 75%, e mais preferencialmente menos de cerca de 90% dos componentes celulares aos quais estava originalmente associado. O termo "substancialmente puro" indica o grau mais elevado de pureza que pode ser alcançado utilizando técnicas de purificação convencionais conhecidas na técnica.

Os polinucleótidos são "hibridizáveis" uns com os outros quando, pelo menos, um filamento de um polinucleótido puder ser recozido com outro polinucleótido em condições de rigor definidas. O rigor da hibridação é determinado, por ex., através da temperatura em que a

hibridação e/ou a lavagem são efetuadas e da força iónica e polaridade (por ex., formamida) das soluções de lavagem e hibridação, bem como de outros parâmetros. A hibridação necessita que os dois polinucleótidos contendam sequências substancialmente complementares; dependendo do rigor da hibridação, contudo, podem ser toleradas disparidades. Tipicamente, a hibridação de duas sequências num rigor elevado (tal como, por exemplo, numa solução aquosa de 0,5xSSC a 65 °C) necessita que as sequências mostrem algum grau elevado de complementaridade em relação a toda a respetiva sequência. As condições de rigor intermédio (tal como, por exemplo, uma solução aquosa de 2xSSC a 65 °C) e baixo rigor (tal como, por exemplo, uma solução aquosa de 2xSSC a 55 °C) necessitam correspondentemente de menos complementaridade global entre as sequências de hibridação. (1xSSC corresponde a 0,15 M NaCl, 0,015 M Na de citrato.) Os polinucleótidos que “hibridizam” com os polinucleótidos aqui podem ter qualquer comprimento. Numa forma de realização, esses polinucleótidos têm, pelo menos, 10, preferencialmente, pelo menos, 15 e, mais preferencialmente, pelo menos, 20 nucleótidos de comprimento. Noutra forma de realização, os polinucleótidos que são hibridizados têm aproximadamente o mesmo comprimento. Noutra forma de realização, os polinucleótidos que são hibridizados incluem os que são recozidos em condições de rigor adequadas e que codificam polipéptidos ou enzimas com a mesma função, tal como a aptidão para ligar a p53 (no caso de E6) ou ligar a Rb (no caso de E7).

As técnicas e as ferramentas de engenharia genética gerais aqui abordadas, incluindo a transformação e a expressão, a utilização de células hospedeiras, os vetores, os sistemas de expressão, etc., são bem conhecidas na técnica.

Conforme aqui utilizado, o termo “cerca de” ou “aproximadamente” significa dentro de 50% de um determinado

valor, preferencialmente dentro de 20%, mais preferencialmente dentro de 10%, ainda mais preferencialmente dentro de 5% e o mais preferencialmente dentro de 1% de um determinado valor. Em alternativa, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa que um valor pode situar-se num intervalo de erro cientificamente aceitável para esse tipo de valor, o que dependerá do quão qualitativa uma medição pode ser tendo em conta as ferramentas disponíveis. O termo "cerca de" ou "aproximadamente" pode definir uma distribuição em torno de um valor médio, em vez de um único valor.

As composições imunogénicas e farmacêuticas da invenção

A presente invenção fornece composições imunogénicas e farmacêuticas que compreendem polipéptidos de fusão e polinucleótidos do vírus do papiloma humano E6 e E7. Estas composições podem ser utilizadas para tratar e/ou prevenir cancros induzidos por vírus do papiloma, tais como cancro do colo do útero, e lesões do colo do útero, tais como CIN. Estas composições também podem ser utilizadas para tratar cancros de trato gastrointestinal inferior, tais como cancro do ânus, e outros cancros do sistema reprodutor, tais como cancro do pénis e da vulva.

Noutra forma de realização, a presente invenção fornece composições imunogénicas e farmacêuticas que compreendem fusões de polipéptidos e fusões de polinucleótidos de múltiplos vírus do papiloma. Por exemplo, a presente divulgação fornece composições imunogénicas e farmacêuticas que compreendem fusões de proteínas E6 e E7 de múltiplos membros da família HPV, tais como HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Os exemplos de polipéptidos E6 HPV são ilustrados nas Figuras 2A a E e as sequências de aminoácidos de E6 de HPV 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são apresentadas nas SEQ. ID N.ºs 15 a 26, respetivamente. As sequências de nucleótidos que codificam estes polipéptidos

E6 HPV são apresentadas nas SEQ. ID N.ºs 42 a 53, respetivamente. Os exemplos de polipéptidos E7 HPV são ilustrados nas Figuras 3A a C e as sequências de aminoácidos de E7 de HPV 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são apresentadas nas SEQ. ID N.ºs 27 a 38, respetivamente. As sequências de nucleótidos que codificam estes polipéptidos E7 HPV são apresentadas nas SEQ. ID N.ºs 54 a 65, respetivamente. Estas fusões contêm mutações nos resíduos identificados através de alinhamento para corresponderem aos resíduos que sofreram uma mutação em HPV16 aqui descritos, ou que correspondem às sequências conservadas conforme ilustrado nas sequências de consenso E6 e E7 (SEQ. ID N.ºs 39 e 40, respetivamente) que interferem na característica oncogénica da proteína sem interferir na respetiva aptidão de induzir uma resposta imunitária. A presente divulgação fornece composições imunogénicas e farmacêuticas que compreendem uma fusão que compreende polipéptidos E6 e E7 de membros diferentes da família do vírus do papiloma. Por exemplo, uma fusão pode compreender numa única construção qualquer combinação possível de E6 e E7 de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

O número de polipéptidos E7E6 presentes numa fusão é limitado apenas pelas limitações de tamanho do vetor ou mecanismo de transporte nos quais estas composições são administradas. Por exemplo, os vírus, constrangidos pelas limitações estruturais, só podem embalar uma determinada quantidade de ácido nucleico. Os peritos na técnica reconhecem a capacidade de vírus diferentes para embalar ácido nucleico e reconhecem que é habitual rastrear ácidos nucleicos com um tamanho apropriado para a embalagem.

Em alternativa, as composições imunogénicas e farmacêuticas da presente divulgação podem compreender múltiplas fusões diferentes de E7E6. Por exemplo, a composição imunogénica ou farmacêutica pode compreender

múltiplas partículas virais, cada uma com fusões diferentes de sequências E6 e E7 de vírus do papiloma diferentes.

As composições imunogênicas e farmacêuticas que compreendem fusões de E7E6 de múltiplos vírus do papiloma são particularmente vantajosas, uma vez que geram uma resposta imunitária a múltiplas proteínas E6 e E7 e, por conseguinte, previnem câncros e neoplasias causados por cada um destes vírus. Por exemplo, cada HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 foi associado a carcinoma do colo do útero e/ou neoplasias intraepiteliais (*Harrison's Principles of Internal Medicine* Décima Quinta Edição, 2001, 1119; Braunwald et al., Eds., McGraw-Hill). Deste modo, uma fusão de, por exemplo, polipéptidos E6 e E7 HPV16 e 18 irá fornecer prevenção e tratamento de câncros de duas etiologias diferentes. As composições que compreendem polipéptidos E6 e E7 de múltiplos vírus diferentes são um meio particularmente eficaz de tratar e/ou prevenir uma vasta gama de câncros induzidos por vírus do papiloma, tais como cancro do colo do útero, lesões do cancro do colo do útero, tais como CIN, câncros de trato gastrointestinal inferior, tais como cancro do ânus, e outros câncros do sistema reprodutor, tais como cancro do pênis e da vulva.

O perito na técnica irá reconhecer métodos de determinação da segurança das composições imunogênicas. Os métodos exemplares para determinar se, por exemplo, as fusões E7E6 diminuíram ou revogaram a capacidade de transformação e imortalização incluem: a determinação de níveis p53 e/ou Rb através de, por exemplo, *Western blot*, ensaios de ágar-ágar macio, a transfeção de queratinócitos primários ou células epiteliais mamárias e a identificação de perda de senescência, e a transfeção de células e a identificação de alterações na morfologia celular. Além destes ensaios funcionais, podem ser utilizados ensaios bioquímicos. Por exemplo, a ligação de E6 e E7 a proteínas

celulares, tais como p53, E6 TP-1, telomerase e Rb, pode ser medida.

A avaliação dos níveis de p53 e Rb é um método de determinação da segurança de partículas virais recombinantes, tais como VEE, compreendendo fusões E7E6. Os níveis de estado estável de p53 e Rb em MECs humanas primárias foram avaliados a seguir à infecção com VRP que expressa E6 e E7 HPV16 de tipo selvagem, como proteínas de fusão ou individuais, proteína de fusão E7E6 TetM ou GFP como um controlo negativo. A infecção com VRP de MECs revelou níveis grandemente reduzidos de p53 e Rb em culturas com formas de tipo selvagem de E6 e E7, respetivamente; a simples fusão de E7 com E6 não foi suficiente para enfraquecer a atividade das proteínas (Figuras 8A e B). Em oposição, as MECs infetadas com VRPs E7E6 TetM com mutações E6 (^{63}C e ^{106}C) e E7 (^{24}C e ^{26}E) continham níveis normais de p53 e Rb (Figuras 8A e B), indicando que estas quatro mutações extinguíram a atividade oncogénica primária destas proteínas.

Uma vez que a erradicação de tumores estabelecidos necessita da indução de uma forte resposta imunitária mediada por células T contra os antígenos virais E6 e E7 específicos do tumor, foram escolhidos os replicões da encefalite equina venezuelana (VEE) como o vetor de composição imunogénica. Contudo, qualquer método de transporte de genes ou proteínas pode ser utilizado para administrar e empacotar as composições imunogénicas da presente invenção. Por exemplo, podem ser utilizados outros vetores virais conhecidos dos peritos na técnica, ou os nucleótidos que codificam os polipéptidos de fusão mutantes podem ser administrados diretamente através de um plasmídeo.

Os vetores AV recombinantes, do qual VEE é membro, são particularmente versáteis, uma vez que podem ser iniciados como ARN nu, ADN de plasmídeo nu ou como partículas, com as

últimas sendo a formulação mais eficaz para a utilização nas composições imunogénicas. Uma propriedade característica de VRPs em comparação com os outros replicões AV é o respetivo tropismo para células dendríticas (MacDonald, G.H. *et al.*, *J Virol* 2000, 74:914-922). As células dendríticas definidas como alvo para VRP podem ser veículos altamente eficazes para transportar antígenos para gânglios linfáticos e podem ser uma estratégia de economia de doses eficaz.

As composições imunogénicas, particularmente os ácidos nucleicos, da presente invenção podem ser administradas através de vetores virais, tais como lentivírus, retrovírus, vírus herpes, adenovírus, vírus adeno-associados, vírus vaccinia, baculovírus, alfavírus e outros vírus recombinantes com tropismo celular desejável. É possível utilizar uma grande variedade de alfavírus como vetores virais, incluindo, por exemplo, vetores de vírus Sindbis, vírus da floresta de Semliki (ATCC VR 67; ATCC VR 1247), vírus Ross River (ATCC VR 373; ATCC VR 1246) e vírus da encefalite equina venezuelana (ATCC VR 923; ATCC VR 1250; ATCC VR 1249; ATCC VR 532). Os exemplos representativos desses sistemas de vetor incluem os descritos nas Patentes U.S. n.ºs 5.091.309; 5.217.879; e 5.185.440; e nas Publicações de Patente internacionais n.ºs WO 92/10578; WO 94/21792; WO 95/27069; WO 95/27044; e WO 95/07994. A definição de alvos para regiões específicas de células é igualmente fornecida, por exemplo, a definição de alvos de modo a que o polipéptido de fusão se encontre na membrana celular, conforme descrito na Patente U.S. n.º 6.228.621.

Deste modo, um gene que codifica uma fusão de polipéptidos E7E6 pode ser introduzido *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* utilizando um vetor viral ou através da introdução direta de um ácido nucleico, tal como um ADN ou ARN do replicão. A expressão em tecidos definidos como alvo pode

ser efetuada definindo como alvo o vetor recombinante para células específicas, tal como com um vetor viral ou um ligando do recetor, ou utilizando um promotor específico do tecido, ou ambos. A administração de genes definidos como alvo é descrita na Publicação de Patente internacional WO 95/28494.

Os vetores virais habitualmente utilizados para procedimentos de terapia e definição de alvos *in vivo* ou *ex vivo* são vetores baseados em ADN e vetores retrovirais. Os métodos de construção e utilização de vetores virais são conhecidos na técnica (consulte, por ex., Miller e Rosman, *BioTechniques* 1992, 7:980-990). Preferencialmente, os vetores virais são de replicação defeituosa, ou seja, não conseguem replicar-se autonomamente na célula-alvo. Em geral, os genomas dos vetores virais de replicação defeituosa que são utilizados no âmbito da presente invenção não têm, pelo menos, uma região necessária para a replicação do vírus na célula infetada. Estas regiões podem ser eliminadas (total ou parcialmente), ou apresentadas como não funcionais através de qualquer técnica conhecida de um perito na técnica. Estas técnicas incluem a deleção total, a substituição (por outras sequências, em particular pelo ácido nucleico inserido), a deleção parcial ou a adição de uma ou mais bases a uma região essencial (para replicação) (de modo a causar uma deslocação da grelha - *frameshift*). Essas técnicas podem ser efetuadas *in vitro* (no ADN isolado) ou *in situ*, utilizando as técnicas de manipulação genética ou através de tratamento com agentes mutagénicos. Preferencialmente, o vírus de replicação defeituosa conserva as sequências do respetivo genoma necessárias para a encapsidação das partículas virais.

Os vetores virais incluem um vírus de ARN ou ADN defeituoso ou atenuado, tais como, mas sem limitação, vírus herpes Simplex (HSV), vírus Epstein Barr (EBV), adenovírus, vírus adeno-associado (AAV), VEE e afins. Os vírus

defeituosos, que na totalidade ou quase na totalidade não têm genes virais, são os preferidos. Os vírus defeituosos não geram progenitura após a introdução na célula. A utilização de vetores virais defeituosos permite a administração nas células numa área localizada específica sem a preocupação de o vetor viral se espalhar e infetar outras células. Deste modo, é possível definir especificamente como alvo um determinado tecido. Os exemplos de vetores específicos incluem, mas sem limitação, o sistema VEE de replicação defeituosa, conforme descrito por Pushko *et al.* (*Virology* 1997, 239:389-401), e um vetor de adenovírus atenuado, tal como o vetor descrito por Stratford-Perricaudet *et al.* (*J. Clin. Invest.* 1992, 90:626-630; consulte igualmente La Salle *et al.*, *Science* 1993, 259:988-990), e um vetor de vírus adeno-associado defeituoso (Samulski *et al.*, *J. Virol.* 1987, 61:3096-3101; Samulski *et al.*, *J. Virol.* 1989, 63:3822-3828; Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1988, 8:3988-3996).

Várias empresas produzem vetores virais comercialmente, incluindo, mas não se limitando de modo algum a, Avigen, Inc. (Alameda, CA; vetores AAV), Cell Genesys (Foster City, CA; vetores retrovirais, adenovirais, AAV e vetores lentivirais), Clontech (vetores retrovirais e baculovirais), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; vetores adenovirais e AAV), Genvec (vetores adenovirais), IntroGene (Leiden, Países Baixos; vetores adenovirais), Molecular Medicine (vetores retrovirais, adenovirais e AAV), Norgen (vetores adenovirais), Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; vetores lentivirais), Transgene (Estrasburgo, França; vetores adenovirais, *vaccinia*, retrovirais e lentivirais), AlphaVax (vetores alfavirais, tais como vetores VEE) e Invitrogen (Carlsbad, Califórnia).

Noutra forma de realização, o vetor pode ser introduzido *in vivo* através de lipofecção, como ADN nu, ou com outros agentes facilitadores de transfecção (péptidos,

polímeros, bupivacaína, etc.). Os lípidos catiónicos sintéticos podem ser utilizados para preparar lipossomas para a transfeção *in vivo* de um gene que codifica um marcador (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 1987, 84:7413-7417; Felgner e Ringold, *Science* 1989, 337:387-388; Mackey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 1988, 85:8027-8031; Ulmer *et al.*, *Science* 1993, 259:1745-1748). As composições e compostos de lípidos úteis para a transferência de ácidos nucleicos são descritos nas Publicações de Patente internacionais WO 95/18863 e WO 96/17823, e na Patente U.S. n.º 5.459.127. Os lípidos podem ser unidos quimicamente a outras moléculas para efeitos de definição de alvos (consulte, Mackey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 1988, 85:8027-8031). Os péptidos definidos como alvo, por ex. hormonas ou neurotransmissores, e as proteínas, tais como anticorpos, ou as moléculas não peptídicas podem ser unidos quimicamente a lipossomas. Outras moléculas são igualmente úteis para facilitar a transfeção de um ácido nucleico *in vivo*, tal como um oligopéptido catiónico (por ex., Publicação de Patente internacional WO 95/21931), péptidos derivados de proteínas de ligação de ADN (por ex., Publicação de Patente internacional WO 96/25508), ou um polímero catiónico (por ex., Publicação de Patente internacional WO 95/21931).

É igualmente possível introduzir o vetor *in vivo* como um plasmídeo de ADN nu. Os vetores de ADN nu para terapia de genes podem ser introduzidos nas células hospedeiras desejadas através de métodos conhecidos na técnica, por ex., eletroporação, microinjeção, fusão de células, DEAE-dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, utilização de um bombardeamento de genes (por exemplo, o sistema de bombardeamento de genes Helios (Bio-Rad; Hercules, CA) pode ser utilizado para administração de genes epidérmica), ou a utilização de um transportador de vetores de ADN (consulte,

por ex., Wu et al., *J. Biol. Chem.* 1992, 267:963-967; Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 1988, 263:14621-14624; Hartmut et al., Pedido de Patente canadiana n.º 2.012.311, registado a 15 de março de 1990; Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 1991, 88:2726-2730). As abordagens de ministração de ADN mediada por recetor também podem ser utilizadas (Curiel et al., *Hum. Gene Ther.* 1992, 3:147-154; Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 1987, 262:4429-4432). As Patentes U.S. n.ºs 5.580.859 e 5.589.466 divulgam a administração de sequências de ADN exógeno, sem agentes facilitadores de transfeção, num mamífero. Em alternativa, o ADN é formulado em composições com agentes facilitadores de transfeção, que facilitam a imunização, tais como bupivacaína e outros anestésicos locais (Patente U.S. n.º 6.127.170). Recentemente, foi descrita uma técnica de transferência de ADN *in vivo* de eficácia elevada e tensão relativamente baixa, designada por eletrotransferência (Mir et al., *C.P. Acad. Sci.* 1998, 321:893; WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175).

O termo "composição imunogénica", conforme aqui utilizado, refere-se em geral a quaisquer composições que possam ser administradas para desencadear uma resposta imunogénica no recipiente. De um modo geral, uma composição imunogénica compreende uma dose imunologicamente eficaz de um imunogénio (por ex., um antigénio de um agente infeccioso) e um portador farmacêuticamente aceitável e, opcionalmente, um adjuvante. O portador farmacêuticamente aceitável pode ser água esterilizada ou salina isotónica esterilizada, bem como todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de adiamento isotónicos e de absorção e afins, compatíveis com a administração em seres humanos. O portador apropriado será evidente para os peritos na técnica e dependerá em grande parte da via de administração.

Uma composição imunogénica pode ser administrada num organismo, por ex., através de inalação ou insuflação (quer pela boca quer pelo nariz), ou por administração oral, bucal, vaginal, retal ou parentérica (por ex., através de injeção subcutânea, intradérmica, intramuscular, intraorbitária, intracapsular, intraespinal, intraesternal, intraperitoneal ou intravenosa e afins). Uma composição imunogénica também pode ser administrada através de transferência mediada por partículas (por ex., utilizando um “bombardeamento de partículas”). Consulte, por exemplo, Gainer *et al.*, *J. Neurooncol* 2000, 47:23-30; Koide *et al.*, *Jpn J. Pharmacol* 2000, 83:167-174; Kuriyama *et al.*, *Gene Ther.* 2000, 7:1132-1136; e Yamauchi *et al.*, *J. Exp. Zool.* 2000, 287:285-293. Esses métodos de transferência de partículas são particularmente preferidos para composições imunogénicas de ADN ou vetor, por ex., utilizando um “bombardeamento de genes”. A via de administração apropriada é selecionada por um médico assistente consoante a natureza da composição imunogénica utilizada, uma avaliação da idade, do peso, do sexo e da saúde geral do paciente, os antigénios presentes na composição imunogénica e fatores semelhantes.

Uma composição imunogénica pode compreender, por exemplo, uma suspensão de um agente infeccioso atenuado ou inativado (por ex., um microrganismo, tal como uma bactéria ou um vírus, um parasita ou outro agente patogénico, etc.) que causa uma doença infecciosa. Em alternativa, uma composição imunogénica da invenção pode ser uma composição imunogénica de polipéptidos ou uma composição imunogénica de ADN. O termo “composição imunogénica de polipéptidos” refere-se a uma composição imunogénica que compreende um polipéptido imunogénico, por exemplo um polipéptido derivado de um agente infeccioso que pode ser um agente antigénico e, por conseguinte, ativar uma resposta imunitária num organismo. O termo “composição imunogénica

de ADN" é aqui utilizado para fazer referência a composições imunogénicas ministradas por meio de um vetor recombinante. Um termo alternativo aqui utilizado é "composição imunogénica de vetor" (uma vez que alguns potenciais vetores, por exemplo alfavírus, são vírus ARN, e uma vez que, em alguns casos, pode ser ministrado ARN não viral em vez de ADN nas células).

O termo "dose imunologicamente eficaz" refere-se à quantidade de um composto ou composições suficiente para resultar numa atividade desejada. Deste modo, conforme utilizado para descrever uma composição imunogénica, uma dose imunologicamente eficaz refere-se à quantidade de um composto ou composições (por ex., um agente antigénico) suficiente para produzir uma resposta imunitária eficaz. Em geral, a seleção da quantidade ou dosagem imunologicamente eficaz apropriada para as composições imunogénicas da presente invenção basear-se-á igualmente na composição imunogénica específica utilizada, bem como na condição física da pessoa, mais especialmente incluindo a saúde geral e o peso da pessoa imunizada. Essa seleção e o ajuste para cima ou para baixo da dose eficaz fazem parte do âmbito da técnica. A quantidade de componente ativo necessária para induzir uma resposta imunitária sem efeitos secundários adversos significativos varia consoante a composição utilizada.

Para vírus recombinantes, preferencialmente de replicação defeituosa, que contêm o ADN que codifica os polipéptidos de fusão E6/E7 mutantes desta invenção, a quantidade imunologicamente eficaz é uma quantidade de vírus recombinante que é eficaz numa via de administração para transfetar as células desejadas da pessoa e fornecer níveis suficientes de expressão do gene selecionado para fornecer o efeito desejado. Os níveis de imunidade podem ser monitorizados para determinar a necessidade, se existir, de reforços.

O termo "adjuvante" refere-se a um composto ou a uma mistura que melhora a resposta imunitária a um agente antigénico. Um adjuvante pode servir, por ex., como um depósito de tecido que liberta lentamente o agente antigénico, e igualmente como um ativador do sistema linfático que melhora a resposta imunitária (consulte, Hood et al., *Immunology*, Segunda Edição, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, Califórnia, pág. 384). Esses adjuvantes também incluem, entre outros, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT), que é descrito na Patente U.S. n.º 4.912.094. Igualmente adequados para a utilização como adjuvantes são os compostos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), ou derivados ou análogos dos mesmos, que estão disponíveis em Corixa (Hamilton, MT), e que são descritos na Patente U.S. n.º 6.113.918. Um desses AGP é 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosida, também conhecido como 529 (anteriormente conhecido como RC529). Este adjuvante 529 é formulado como uma forma aquosa ou como uma emulsão estável.

Outros adjuvantes incluem emulsões de água e óleo mineral, sais de alumínio (alum), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, etc., anfigénio, avridina, L121/esqualeno, D-láctide-poliláctide/glicósido, muramil dipéptido, *Bordetella* destruída, saponinas, tais como Quil A ou Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descritos na Patente U.S. n.º 5.057.540, e partículas geradas daí, tais como ISCOMS, (complexos imunoestimuladores), *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolissacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos, tais como oligonucleótidos que contêm um motivo CpG (Patente U.S. n.º 6.207.646), toxina de cólera (quer numa forma de tipo selvagem quer numa forma mutante, por ex. em

que o ácido glutâmico na posição de aminoácido 29 é substituído por outro aminoácido, preferencialmente uma histidina, de acordo com a Publicação de Patente internacional n.º WO 00/18434), uma toxina pertussis (PT), ou uma toxina lábil ao calor (LT) da *E. coli*, particularmente LT-K63, LT-R72, CTS109, PT-K9/G129; consulte, por ex., as Publicações de Patente internacionais n.ºs WO 93/13302 e WO 92/19265. Várias citocinas e linfocinas são adequadas para a utilização como adjuvantes. Um desses adjuvantes é o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), que tem uma sequência de nucleótidos conforme descrito na Patente U.S. n.º 5.078.996. Um plasmídeo que contém ADNc GM-CSF foi transformado em *E. coli* e foi depositado com o ATCC (Coleção Americana de Culturas Celulares), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, com o Número de Acesso 39900. A citocina Interleucina-12 (IL-12) é outro adjuvante que é descrito na Patente U.S. n.º 5.723.127. Outras citocinas ou linfocinas mostraram ter atividade de modulação imune, incluindo, mas não se limitando a, interleucinas 1-alfa, 1-beta, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 18, 15, 16, 17 e 18, interferões-alfa, beta e gama, fator estimulador de colônias de granulócitos, e fatores alfa e beta de necrose tumoral, e são adequadas para a utilização como adjuvantes.

Outros adjuvantes adequados incluem, mas não se limitam a: substâncias tensioativas (por ex., hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de aminoácido de octadecilo, lisolecitina, brometo de dimetil-diocadecilamónio), metoxihexadecilglicerol e polióis plurónicos; poliaminas, por ex. pirano, sulfato de dextrano, poli IC, carbopol; péptidos, por ex. muramil dipéptido, dimetilglicina, tuftsina; emulsões de óleo; e geles minerais, por ex. fosfato de alumínio, etc., e complexos de estimuladores imunes. O imunogénio também pode

ser incorporado nos lipossomas, ou conjugado com polissacáridos, lipopolissacáridos e/ou outros polímeros para a utilização numa composição imunogénica.

Os adjuvantes exemplares incluem, mas não se limitam a, adjuvante incompleto de Freund, substâncias tensioativas (por exemplo, lisolecitina), polióis plurónicos, polianiões, péptidos, emulsões de hidrocarboneto ou óleo. Os adjuvantes exemplares incluem igualmente adjuvantes humanos potencialmente úteis, tais como BCG (bacilo de Calmette-Guérin) e *Corynebacterium parvum*. Além disso, as proteínas imunoestimuladoras, tais como quimocinas, ou as sequências de ácido nucleico que codificam as quimocinas, podem ser fornecidas como um adjuvante para aumentar a resposta imunitária a uma composição imunogénica.

A expressão “farmaceuticamente aceitável” refere-se a composições e entidades moleculares que são fisiologicamente toleráveis e não produzem normalmente uma reação desagradável alérgica ou semelhante (por exemplo, indisposição gástrica, tonturas e afins) quando administradas a um indivíduo. De preferência, e particularmente quando uma composição imunogénica é utilizada em seres humanos, o termo “farmaceuticamente aceitável” pode significar que é aprovado por uma agência reguladora (por exemplo, a Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos) ou registado numa farmacopeia reconhecida geralmente para a utilização nos animais (por exemplo, a Farmacopeia dos Estados Unidos).

O termo “portador” refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual um composto é administrado. As soluções de salina aquosa ou água esterilizada e as soluções de glicerol e dextrose aquosa são, de preferência, utilizadas como portadores, particularmente para soluções injetáveis. Os portadores farmacêuticos adequados exemplares são descritos em “Remington's Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin.

A toxicidade e a eficácia terapêutica dos compostos podem ser determinadas através de procedimentos farmacêuticos padrão, por exemplo em ensaios de cultura de células ou mediante a utilização de animais experimentais para determinar o LD50 e o ED50. Os parâmetros LD50 e ED50 são bem conhecidos na técnica e referem-se às doses de um composto que são letais para 50% de uma população e terapeuticamente eficazes em 50% de uma população, respetivamente. A relação de dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é referida como o índice terapêutico e pode ser expressa como a relação: LD50/ED50. Os compostos que mostram grandes índices terapêuticos são preferidos. Embora possam ser utilizados compostos que mostrem efeitos secundários tóxicos. Contudo, nesses casos, é particularmente preferível utilizar sistemas de ministração que definam especificamente como alvo esses compostos para o local do tecido afetado, de modo a minimizar possíveis danos noutras células, tecidos ou órgãos, e reduzir os efeitos secundários.

Os dados obtidos a partir do ensaio de cultura de células ou de estudos em animais podem ser utilizados para formular uma série de dosagens para a utilização nos seres humanos. A dosagem dos compostos utilizados nos métodos terapêuticos da presente invenção situa-se preferencialmente numa gama de concentrações de circulação que inclui a concentração de ED50, mas com pouca ou nenhuma toxicidade (por ex., abaixo da concentração de LD50). A dosagem específica utilizada em qualquer aplicação pode variar nesta gama, dependendo de fatores, tais como a forma de dosagem específica empregue, a via de administração utilizada, as condições do indivíduo (por ex., paciente), e assim por diante.

Os animais não humanos incluem, mas não se limitam a, animais de laboratório, tais como ratinhos, ratos, coelhos, hamsters, porquinhos-da-índia, etc.; animais domésticos,

tais como cães e gatos; animais de criação, tais como ovelhas, cabras, porcos, cavalos e vacas; e primatas não humanos.

Uma dose terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente estimada a partir de ensaios de cultura de células e formulada em modelos animais para obter uma gama de concentração de circulação que inclua o IC50. A concentração de IC50 de um composto é a concentração que atinge uma inibição quase máxima de sintomas (por ex., conforme determinado a partir dos ensaios de cultura de células). As dosagens apropriadas para a utilização num determinado indivíduo, por exemplo em pacientes humanos, podem assim ser determinadas de modo mais exato utilizando essas informações.

O termo "tratar" significa tentar desencadear uma resposta antitumoral contra as células do tumor, ou seja, o cancro. Uma resposta antitumoral inclui, mas sem limitação, mais tempo de sobrevivência, inibição da metástase do tumor, inibição do crescimento do tumor, regressão do tumor, e desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH) às células tumorais não modificadas.

As quantidades dos compostos no plasma podem ser medidas habitualmente num indivíduo, tal como um paciente, através de técnicas, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia gasosa.

As composições farmacêuticas para a utilização de acordo com a presente invenção podem ser formuladas de modo convencional utilizando um ou mais excipientes ou portadores fisiologicamente aceitáveis.

Deste modo, os compostos e respetivos solventes e sais fisiologicamente aceitáveis podem ser formulados para a administração através das vias descritas acima.

Para a administração oral, as composições farmacêuticas podem ter a forma de, por exemplo, pastilhas

ou cápsulas preparadas através de meios convencionais com excipientes farmacologicamente aceitáveis, tais como agentes de ligação (por ex., amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropil metilcelulose); enchimentos (por ex., lactose, celulose microcristalina ou hidrogenofosfato de cálcio); lubrificantes (por ex., estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (por ex., amido de batata ou glicolato de amido de sódio); ou agentes de humedecimento (por ex., laurilsulfato de sódio). As pastilhas podem ser revestidas através de métodos bem conhecidos na técnica. Os preparados líquidos para a administração oral podem ter a forma de, por exemplo, soluções, xaropes ou suspensões, ou podem ser apresentados como um produto seco para a constituição com água ou outro veículo adequado antes da utilização. Esses preparados líquidos podem ser apresentados através de meios convencionais com aditivos farmacologicamente aceitáveis, tais como agentes de suspensão (por ex., xarope de sorbitol, derivados de celulose ou gorduras alimentares hidrogenadas); agentes de emulsão (por ex., lecitina ou acácia); veículos não aquosos (por ex., óleo de amêndoa, ésteres oleosos, álcool etílico ou óleos vegetais fracionados); e conservantes (por ex., metil ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). Os preparados também podem conter sais tampão, agentes aromatizantes, corantes ou adoçantes, conforme apropriado.

Os preparados para a administração oral podem ser formulados de modo adequado para fornecer uma libertação controlada do composto ativo. Para a administração bucal, as composições podem ter a forma de pastilhas ou rebuçados formulados de modo convencional.

Para a administração por inalação, os compostos para a utilização de acordo com a presente invenção são ministrados de modo conveniente na forma de uma apresentação de pulverizador de aerossol de embalagens

pressurizadas ou um nebulizador, com a utilização de um propulsor adequado, por ex., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada através do fornecimento de uma válvula para ministrar uma quantidade medida. As cápsulas e os cartuchos de, por ex., gelatina para utilização num inalador ou insuflador podem ser formulados com uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada, tal como lactose ou amido.

Os compostos podem ser formulados para administração parentérica por injeção, por ex., através de injeção em bolo ou infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por ex., em ampolas ou em recipientes multidose, com um conservante adicionado. As composições podem ter essas formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, estabilização e dispersão. Em alternativa, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para a constituição com um veículo adequado, por ex., água livre de pirogénio esterilizada, antes da utilização.

Os compostos também podem ser formulados em composições retais, tais como supositórios ou enemas de retenção, por ex., com bases de supositório convencionais, tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos.

Além das formulações descritas anteriormente, os compostos também podem ser formulados como um preparado de ação prolongada. Essas formulações de ação prolongada podem ser administradas por implantação (por exemplo, de forma subcutânea ou intramuscular) ou por injeção intramuscular. Deste modo, por exemplo, os compostos podem ser formulados com materiais hidrofóbicos ou poliméricos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável), resinas de

permuta iônica, ou como derivados moderadamente solúveis, por exemplo, como um sal moderadamente solúvel.

As composições podem, se desejado, ser apresentadas numa embalagem ou dispositivo dispensador que pode conter uma ou mais formas de dosagem unitárias com o ingrediente ativo. A embalagem pode, por exemplo, compreender uma folha de metal ou de plástico, tal como uma embalagem almofadada. A embalagem ou dispositivo dispensador pode incluir instruções de administração.

Os termos utilizados nesta especificação têm geralmente os respetivos significados habituais na técnica, no contexto desta invenção e no contexto específico em que cada termo é utilizado. Para fornecer orientações adicionais ao médico, são abordados determinados termos na especificação ao descrever as composições e os métodos da invenção e como utilizá-los.

EXEMPLOS

A presente invenção é descrita através dos seguintes exemplos.

Exemplo 1. CONCEÇÃO E GERAÇÃO DE CONSTRUÇÕES DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS HPV16.

Materiais e Métodos

Geração de construções do replicão VEE. Os genes E6 e E7 HPV16 foram obtidos a partir de pHPV-16 (ATCC, n.º 45113) através de métodos PCR (Horton *et al.*, *Gene* 1989, 77:61-8), e fundidos em duas orientações diferentes para gerar grelhas de leitura abertas (ORFs) de 744 pares de base (bp) que codificam 248 aminoácidos para todas as construções. O codão de iniciação de metionina de cada ORF a jusante foi removido para eliminar qualquer possibilidade de iniciação interna. Os nucleótidos específicos das ORFs fundidas sofreram uma mutagénese utilizando o QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (kit de mutagénese específica de um local QuikChange®) (Stratagene; La Jolla, CA). Os genes fundidos de tipo selvagem (wt) e mutantes (mut) foram

subclonados no vetor pVR200 (Alpha Vax; Durham, NC), um plasmídeo derivado do ADNc de um mutante não neurotrófico altamente atenuado (V3014) da estirpe Trinidad Donkey da encefalite equina Venezuelana (VEE) (Grieder, F.B. *et al.*, *Virology* 1995, 206:994-1006). O plasmídeo pVR200 é descrito em Pushko *et al.*, (*Virology* 1997, 239:389-401, consulte, em particular, as págs. 390 e 391 "Cell lines and plasmids" e a pág. 393, Figura 1b). Em resumo, este plasmídeo tem o promotor T7 seguido de genes não estruturais VEE, do promotor subgenômico 26S, do local de clonagem para os genes de interesse (na presente invenção, as fusões E6/E7), e de um local de linearização *NotI*.

As partículas de replicação VEE (VRPs) de replicação incompetente foram preparadas através do método auxiliar de divisão e tituladas conforme descrito (Pushko *et al.*, *Virology* 1997, 239:389-401). Resumidamente, o plasmídeo pVR200 (com as fusões de interesse clonadas) foi cotransfetado para as células juntamente com: (1) uma construção auxiliar de codificação de cápsides, e (2) uma construção auxiliar de codificação de glicoproteínas. Nenhuma destas construções auxiliares tinha sequências de embalagens e, por conseguinte, não foram incorporadas nas VRPs. Deste modo, as VRPs resultantes eram de replicação defeituosa. A potência de cada preparado VRP, expressa como unidades/mililitro (IU/ml) infecciosas, foi definida pelo número de partículas E7 positivas conforme determinado através de titulação nas células de rim de hamster bebê (BHK)-21. As titulações de todos os preparados VRP excederam 10^9 de IU por eletroporação; foi utilizada uma dose eficaz de 3×10^5 de IU por imunização em todos estes estudos e conforme descrito anteriormente (Velders M.P. *et al.*, *Cancer Res* 2001, 61:7861-7867).

Análises por Western blot e Imunofluorescência. As células BHK-21 foram infetadas com as VRPs indicadas. Vinte e quatro horas após a infecção, as células foram colhidas no

tampão de amostra SDS para a análise por *Western blot* ou fixas com metanolacetona para a imunofluorescência. Para detetar a expressão de proteínas através de *Western blot*, as proteínas no lisado de células foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de polivinilideno (PVD) e analisadas com o sistema de deteção *Western Breeze* (Invitrogen; Carlsbad, CA) utilizando um anticorpo monoclonal anti-E7 HPV16 (Zymed; San Francisco, CA). Para a análise de imunofluorescência, as células fixas foram incubadas com um anticorpo primário anti-E7 seguido do anticorpo secundário de cabra antirratinho rotulado com FITC (n.º 554001, Pharmingen; San Diego, CA). Os núcleos das células foram coloridos utilizando Viaprobe (n.º 555815, Pharmingen).

Resultados

Para conceber composições imunogénicas eficazes e seguras contra o cancro do colo do útero induzido por HPV16, a diversidade antigénica foi aumentada através da expressão de ambos os antigénios E6 e E7 específicos do tumor. A inclusão de genes E6 e E7 completos numa composição imunogénica VRP é desejável para maximizar a probabilidade de expressar todos os epítomos possíveis para estimular as células T CD8⁺ e CD4⁺ nas diversas populações humanas HLA de Classe I e Classe II. As fusões das ORFs E6 e E7 foram realizadas em duas orientações diferentes através de PCR, e até cinco aminoácidos sofreram uma mutagénese (Figuras 1A e B) para obter construções de expressão de modo a produzir polipéptidos de fusão E6/E7.

Uma única substituição de aminoácido na posição ⁶³C mostrou ser capaz de destruir diversas funções E6 HPV16: degradação de p53, degradação de E6TP-1, ativação de telomerase e, por conseguinte, a imortalização de células epiteliais primárias (Gao, Q. et al., *J Virol* 2001, 75:4459-4466). E6 HPV16 com uma única mutação de ponto em ¹⁰⁶C não liga nem facilita a degradação de p53 e é incapaz

de imortalizar MECs humanas, um fenótipo dependente da degradação de p53 (Dalal *et al.*, *J Virol* 1996, 70:683-688). A proteína E7 HPV16 do aminoácido 98 liga a Rb através de um motivo L-X-C-X-E; as mutações nas posições ²⁴C e ²⁶E deste motivo destroem a degradação e ligação a Rb (Munger, K, *et al.*, *Oncogene* 2001, 20:7888-7898). Além destas duas mutações de ponto em E7, um terceiro aminoácido, ⁹¹C, sofreu uma mutação para destruir o único dedo de zinco em E7.

Uma primeira proteína de fusão, aqui referida como E6E7wt compreende a sequência de aminoácidos de uma sequência de polipéptidos E6 de tipo de selvagem (SEQ. ID N.º 13) no amino-terminal, e a sequência de aminoácidos de uma sequência de polipéptidos E7 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 14) no carboxi-terminal. Uma sequência de aminoácidos representativa para um polipéptido de fusão desses é fornecida na SEQ. ID N.º 1. Uma sequência de nucleótidos exemplar que codifica um polipéptido de fusão E6E7 de tipo selvagem desses é apresentada na SEQ. ID N.º 2.

Um segundo polipéptido, referido como E6E7TetM, também foi preparado. Tal como o polipéptido de fusão E6E7wt, E6E7TetM compreende uma sequência de polipéptidos E6 no amino-terminal e uma sequência de polipéptidos E7 no carboxi-terminal. Contudo, a sequência de polipéptidos E6 desta construção contém aminoácidos de glicina nos resíduos 63 e 106 do polipéptido E6, em vez dos aminoácidos de cisteína encontrados na sequência de aminoácidos E6 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 13). Além disso, a sequência de polipéptidos E7 desta construção contém aminoácidos de glicina nos resíduos 24 e 26 do polipéptido E7, em vez dos aminoácidos de cisteína (24) e glutamato (26) encontrados na sequência de aminoácidos E7 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 14). Uma sequência de aminoácidos representativa para um polipéptido de fusão desses é fornecida na SEQ. ID N.º 3. Uma sequência de nucleótidos exemplar que codifica um

polipéptido de fusão E6E7TetM desses é apresentada na SEQ. ID N.º 4.

Um terceiro polipéptido, referido como E6E7PentM, também foi preparado. Tal como o polipéptido de fusão E6E7TetM, E6E7PentM compreende uma sequência de polipéptidos E6, que compreende aminoácidos de glicina nos resíduos 63 e 106, no respetivo amino-terminal, e uma sequência de polipéptidos E7, que compreende aminoácidos de glicina nos resíduos 24 e 26, no respetivo carboxi-terminal. Contudo, a sequência de polipéptidos E7 desta proteína de fusão contém igualmente um aminoácido de glicina no resíduo 91 da sequência de polipéptidos E7, em vez do aminoácido de cisteína encontrado na sequência de aminoácidos E7 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 14). Uma sequência de aminoácidos representativa para um polipéptido de fusão desses é fornecida na SEQ. ID N.º 5. Uma sequência de nucleótidos exemplar que codifica um polipéptido de fusão E6E7PentM desses é apresentada na SEQ. ID N.º 6.

Um quarto polipéptido de fusão, referido como E7E6wt, compreende a sequência de aminoácidos de uma sequência de polipéptidos E7 de tipo de selvagem (SEQ. ID N.º 14) no amino-terminal e a sequência de aminoácidos de uma sequência de polipéptidos E6 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 13) no carboxi-terminal. Uma sequência de aminoácidos representativa para um polipéptido de fusão desses é fornecida na SEQ. ID N.º 7. Uma sequência de nucleótidos exemplar que codifica um polipéptido de fusão E7E6wt desses é apresentada na SEQ. ID N.º 8.

Um quinto polipéptido, referido como E7E6TetM, também foi preparado. Tal como o polipéptido de fusão E7E6wt, E7E6TetM compreende uma sequência de polipéptidos E7 no amino-terminal e uma sequência de polipéptidos E6 no carboxi-terminal. Contudo, a sequência de polipéptidos E7 desta construção contém um resíduo de glicina nos aminoácidos 24 e 26 do polipéptido E7, em vez dos

aminoácidos de cisteína (24) e glutamato (26) encontrados na sequência de aminoácidos E7 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 14). Além disso, o polipéptido E6 desta construção contém um resíduo de glicina nos aminoácidos 63 e 106 do polipéptido E6, em vez do aminoácido de cisteína encontrado na sequência de aminoácidos E6 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 13). Uma sequência de aminoácidos representativa para um polipéptido de fusão desses é fornecida na SEQ. ID N.º 9. Uma sequência de nucleótidos exemplar que codifica um polipéptido de fusão E7E6TetM desses é apresentada na SEQ. ID N.º 10.

Um sexto polipéptido, referido como E7E6PentM, também foi preparado. Tal como E7E6TetM, E7E6PentM compreende um polipéptido E7, que compreende aminoácidos de glicina nos resíduos 24 e 26 do polipéptido E7, no respetivo amino-terminal, e um polipéptido E6, que compreende aminoácidos de glicina nos resíduos 63 e 106 do polipéptido E6, no respetivo carboxi-terminal. Contudo, a sequência de polipéptidos E7 desta construção contém igualmente um aminoácido de glicina no resíduo 91 do polipéptido E7, em vez do aminoácido de cisteína encontrado na sequência de aminoácidos E7 de tipo selvagem (SEQ. ID N.º 14). Uma sequência de aminoácidos representativa para um polipéptido de fusão desses é fornecida na SEQ. ID N.º 11. Uma sequência de nucleótidos exemplar que codifica um polipéptido de fusão E7E6TetM desses é apresentada na SEQ. ID N.º 12.

As mutações em E6 e E7 foram concebidas para 1) interromper três dedos de zinco, desestabilizando assim a proteína e acelerando a degradação (e, deste modo, aumentar a imunogenicidade) (^{63}C e ^{106}C de E6; ^{91}C de E7 (Dalal et al., *J Virol* 1996, 70:683-8; Shi et al., *J Virol* 1999, 73:7877-81)); 2) perturbar a degradação de p53 induzida por E6 (^{106}C ; (Dalal et al., *J Virol* 1996, 70:683-8)) e a ligação de E6-TP1 (Gao et al., *J Virol* 2001, 75:4459-66); e

3) interromper a degradação e ligação a Rb através de E7 (^{24}C e ^{26}E ; (Edmonds e Vousden, *J Virol* 1989, 63:2650-6)). Estas mutações foram escolhidas cuidadosamente para permanecerem fora dos epítomos HLA conhecidos, com a exceção de ^{91}C . Embora ^{91}C seja conhecido como sendo parte de um epítopo HLA A2 que abrange os aminoácidos 86 a 93 de E7 (Ressing et al., *J Immunol* 1995, 154:5934-43; Ressing et al., *Cancer Res* 1996, 56:582-8; Evans et al., *Cancer Res* 1997, 57:2943-50), foi decidido submeter este aminoácido a uma mutação para alcançar uma segurança de composição imunogénica máxima, uma vez que esta mutação interrompe um dedo de zinco de E7 conhecido por ser necessário para a respetiva atividade de imortalização (Jewers et al., *J. Virol* 1992, 66:1329-1335). Uma vez que esta mutação não se encontra na região de ancoragem do aminoácido P2 de péptidos com propriedades de ligação HLA-A*0201 conhecidas (Rammensee et al., *Annu Rev Immunol* 1993, 11:213-44), é possível que polipéptidos mutantes C91G possam conservar a respetiva aptidão para ligar a molécula HLA-A*0201. Igualmente, é possível que a mutação C91 possa afetar a divisão de outro epítopo HLA que abrange os aminoácidos 82 a 90 de E7. As construções de fusão que contêm essas cinco mutações de aminoácido foram designadas por PentM.

Embora as mutações em cada um destes locais de E6 e E7 HPV16 tenham sido anteriormente divulgadas em separado, não era sabido que combinações destas mutações, se existissem, manteriam a respetiva imunogenicidade.

Para desenvolver uma composição imunogénica terapêutica de cancro do colo do útero que desencadeie uma resposta forte mediada por células contra os produtos de oncogene viral E6 e E7, estas fusões foram clonadas para o sistema baseado na replicação do vírus da encefalite equina venezuelana (VEE). As vantagens das composições imunogénicas VEE recombinantes incluem níveis elevados de expressão de genes heterólogos, o tropismo de células

dendríticas (definindo assim como alvo a expressão para os tecidos linfoides, um local importante para induzir imunidade), a indução de apoptose e respostas imunitárias humorais e celulares fortes, e uma imunização repetida eficaz, uma vez que não existe nenhuma imunidade geral à VEE nos seres humanos. Além disso, os alfavírus, tais como VEE, replicam o ARN de interesse no citosol da célula e são citopáticos, reduzindo assim significativamente o risco de integração de E6 e E7 no genoma celular.

Para avaliar a expressão destas construções fundidas, as células BHK foram infetadas com as VRPs recombinantes e analisadas subsequentemente através de *Western blot* e imunofluorescência. A análise por *Western blot* revelou que as proteínas de fusão E6E7 migraram geralmente com um peso molecular de cerca de 30 kDa em SDS-PAGE. Embora o nível de expressão das construções de tipo selvagem e mutantes fosse comparável, a respetiva localização intracelular era drasticamente diferente. A coloração por imunofluorescência destas proteínas de fusão revelou um padrão de coloração salpicado de pontos que se sobrepõe aos núcleos de ambas as VRPs E6 e E7 de tipo selvagem, ao passo que foi observada uma coloração perinuclear mais difusa para todas as VRPs TetM e PentM (dados não ilustrados). Essa localização perinuclear difusa sugere uma agregação/dobramento incorreto das proteínas. Esse dobramento incorreto sugere uma instabilidade da proteína, favorecendo ainda que estas fusões tenham uma maior capacidade de desencadear respostas CTL.

Exemplo 2: RESPOSTAS IMUNITÁRIAS CELULARES INDUZIDAS POR CONSTRUÇÕES DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DIFERENTES.

Materiais e Métodos

Ratinhos e linhas celulares. Foram obtidas fêmeas de ratinhos C57BL/6 com 6 a 12 semanas de idade sem agente patogénico específico em Taconic Farms (Germantown, NY). Os ratinhos foram alojados nas instalações para animais da

Wyeth and Loyola University (Chicago) em ótimas condições, com acesso livre a água e alimentos. As fêmeas de ratinhos HLA-A*0201 com 6 a 12 semanas de idade sem agente patogénico específico foram adquiridas nos Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). As células MC57G e EL4 foram utilizadas para ensaios de citotoxicidade. As células BHK-21 foram utilizadas para expressão de ARN VEE, embalagem de partículas do replicação VEE (VRP) e titulação (ensaios de potência). Os estudos de indução do tumor foram efetuados utilizando as linhas tumorais E6E7 positivas C3 (Feltkamp, M.C.W. *et al.*, *Eur J Immun* 1993, 23:2242-2249), TC-1 (Lin, K.Y., *et al.*, *Cancer Res* 1996, 56:21-26) e HLF16. Todas as linhas celulares (exceto as células HLF16, C3 e TC-1) foram obtidas a partir da Coleção Americana de Culturas Celulares (ATCC; Manassas, VA).

Ensaio de citotoxicidade (CTL). Os ratinhos C57BL/6 foram imunizados subcutaneamente com 3×10^5 de unidades infecciosas de VRPs. Os ensaios de citotoxicidade foram efetuados 4 semanas após a imunização dos ratinhos com uma única dose de 3×10^5 da VRP indicada administrada nas patas traseiras. As suspensões de esplenocito de célula única foram reestimuladas (20:1) com células MC57G tratadas com mitomicina infetadas com vetores de vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante que codificam E7 ou E6 (E7-MVA ou E6-MVA) numa multiplicidade de infeção (MOI) de 5. A atividade de CTL foi medida 5 dias depois. As células MC57G infetadas com E7-MVA ou E6-MVA e as células EL-4 pulsadas com péptido E7₄₉₋₅₇ HPV16 restrito a H-2D^b (RAHYNIVTF (SEQ. ID N.º 41, que corresponde aos aminoácidos 49 a 57 da SEQ. ID N.º 14); Lin *et al.*, *Cancer Res* 1996, 56, 21-6) (ATCC) serviram como alvos. As células MC57G foram infetadas durante 1 h com E7-MVA ou E6-MVA numa MOI de 5. As células EL-4 (1×10^7) foram incubadas com péptido (20 µg/ml) durante 1 h. Em seguida, as células-alvo foram rotuladas 3 h depois com Európio (Eu⁺³; Sigma Chemical Co.,

St. Louis, MO) através de eletroporação. As células-alvo e efetoras foram incubadas nas relações indicadas durante 3 h e, em seguida, os sobrenadantes foram colhidos e misturados com uma solução de otimização (Wallac; Turku, Finlândia). A liberação de Eu^{+3} foi quantificada através de fluorescência com resolução temporal utilizando um fluorômetro 1234 Delfia (Wallac). A percentagem de lise específica foi calculada como (liberação espontânea-experimental/liberação espontânea-máxima) $\times 100$. A percentagem de liberações espontâneas variou entre 5 e 10%.

Resultados

Para caracterizar as respostas imunitárias induzidas pelas construções de composições imunogénicas diferentes, os ratinhos C57BL/6 foram imunizados subcutaneamente nas patas traseiras com 3×10^5 de unidades infecciosas das construções VRP de wt e PentM. Um mês após a imunização, a lise mediada por CTL foi medida através do ensaio de liberação de Európio utilizando alvos MC57G infectados com MVA que codifica E6 ou E7. A Figura 4A revela que o CTL de ratinhos imunizados com VRPs de tipo selvagem ou PentM destruíram os alvos de expressão de E7. Foram encontrados resultados idênticos com alvos EL-4 pulsados com péptido E7_{49-57} (dados não ilustrados). A lise mediada por CTL também foi evidente contra alvos E6 de ratinhos imunizados com todas as formas de VRPs, embora a lise fosse substancialmente reduzida nos recipientes de VRPs mutantes (Figura 4B). Estes resultados para a lise específica de E7 e E6 foram reproduzidos em duas experiências adicionais e foram igualmente observados utilizando ratinhos imunizados com VRPs TetM (dados não ilustrados).

Estes resultados mostram que a imunização com VRPs que codificam proteínas de fusão mutantes e de tipo selvagem gerou respostas CTL semelhantes ao epítopo E7_{49-57} imunodominante que é importante na rejeição do tumor.

Enquanto as respostas CTL foram claramente detetáveis contra alvos E6 de animais imunizados com VRPs que expressam genes de tipo selvagem, foram observadas respostas CTL reduzidas nos ratinhos que recebem uma forma mutante de E6, sugerindo que ^{63}C e/ou ^{106}C é um componente importante de um epítopo restrito a H-2^b.

Exemplo 3: EFICÁCIA TERAPÊUTICA E PROTEÇÃO CONTRA TUMORES DAS CONSTRUÇÕES DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS NOS MODELOS DE TUMOR C3 E TC1.

Materiais e Métodos

Proteção contra tumores e experiências terapêuticas.

Grupos de 14 ratinhos C57BL/6 foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de xilazina (Sigma, St. Louis, MO) e 100 mg/kg de cetamina (Abbott Laboratories, Chicago, IL) e imunizados através de injeção de 3×10^5 de VRPs nas patas posteriores nos dias 21 e 7. Os ratinhos de controlo negativo receberam 3×10^5 de IU de VRP de proteína fluorescente verde (GFP). Uma semana depois, metade dos ratinhos de cada grupo foi induzida através de injeções subcutâneas no flanco com 5×10^5 de células C3 (Feltkamp et al., *Eur J Immunol* 1995, 25:2638-42) e metade foi induzida com 5×10^4 de células TC-1 (Lin et al., *Cancer Res* 1996, 56:21-6). O crescimento do tumor foi monitorizado de três em três dias. Para as experiências terapêuticas com C3, os ratinhos foram primeiro induzidos com 5×10^5 de células tumorais C3 no flanco e 7, 14 e 21 dias depois com a VRP indicada com 3×10^5 de dose por imunização. Para a experiência terapêutica com fibroblasto de pulmão humano (HLF), os ratinhos transgênicos HLA-A*0201 foram induzidos com 2×10^6 de células HLF16 através de injeção subcutânea no flanco esquerdo no dia 0. Nos dias 5, 10 e 15 após a indução, os ratinhos foram anestesiados conforme descrito acima e imunizados através de injeção de 3×10^5 de VRPs nas patas posteriores. O crescimento do tumor foi monitorizado de 5 em 5 dias.

Consulte também: Ratinhos e Linhas celulares (acima).

Resultados

As VRPs que codificam proteínas de fusão E7E6PentM e E7E6 de tipo selvagem foram comparadas relativamente à eficácia antitumoral profilática *in vivo*. Os ratinhos de todos os grupos foram imunizados nos dias 0 e 21 com 3×10^5 da VRP indicada e subsequentemente induzidos com células tumorais C3 ou TC-1. Todos os ratinhos que receberam GFP-VRP como um controlo negativo desenvolveram tumores em cerca de 7 dias após a indução do tumor (Figuras 5A e B). Em oposição, todos os ratinhos que receberam E7E6 de tipo selvagem ou PentM foram protegidos contra a indução do tumor independentemente de terem recebido células tumorais C3 (5×10^5) (Figura 5A) ou TC-1 (5×10^4) (Figura 5B). Estes dados sugerem que a proteção não se limitou a um modelo de indução de tumor murino específico e que a proteção dependeu crucialmente dos produtos de genes E6 e E7 codificados por VRP.

Como uma medida mais rigorosa de eficácia antitumoral, na experiência seguinte os ratinhos foram induzidos com células tumorais C3 antes da imunização com VRPs E7E6 de tipo selvagem, PentM ou TetM nos dias 7, 14 e 21. A Figura 6 mostra que 85% a 100% dos ratinhos que receberam qualquer uma das VRPs de expressão de proteínas de fusão E6 e E7 mutantes ou de tipo selvagem rejeitaram tumores C3 em oposição aos 0% a 12% dos ratinhos de controlo negativo. Conforme ilustrado anteriormente por Velders *et al.* (*Cancer Res* 2001, 61:7861-7) e na Figura 6, uma composição imunogénica VRP que expressa o E7 sozinho provocou a rejeição em apenas 65% a 75% dos ratinhos.

Concluindo, a inclusão do gene que codifica E6 como um parceiro de fusão com E7 melhorou de forma reproduzível a eficácia antitumoral terapêutica (85% a 100%, Figura 6) em comparação com o E7 sozinho (67% a 75%, Figura 6), independentemente de E6 ser de tipo selvagem ou mutante.

Por conseguinte, as mutações no E6, quando expressas como uma fusão com E7, não resultaram num efeito antitumoral reduzido nestes modelos de tumor. Contudo, os resultados ilustram que não é possível desencadear respostas CTL ótimas aos epítomos que contêm aminoácidos mutantes em alguns indivíduos imunizados com VRP mutante. Nos seres humanos, isto pode não ser uma causa de preocupação, dada a diversidade de alelos HLA de Classe I e Classe II comparada com o número limitado de alelos H-2 expressos pelos ratinhos C57BL/6.

Exemplo 4: EFICÁCIA TERAPÊUTICA DAS CONSTRUÇÕES DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS NO MODELO DE TUMOR HLF16.

Embora os resultados dos Exemplos 2 e 3 sejam animadores, o reconhecimento de células T restritas a H-2b dos antigénios HPV nos ratinhos C57BL/6 fornece um valor preditivo limitado para respostas antitumorais restritas a HLA. Por conseguinte, a demonstração de que as mesmas composições imunogénicas podem induzir respostas restritas a HLA-A*0201 contra E6 e E7 HPV16 nos ratinhos transgénicos HLA-A*0201 é particularmente importante (Ressing *et al.*, *J Immunol* 1995, 154:5934-5943).

As células T CD8⁺ de ratinhos transgénicos HLA-A*0201 mostraram reconhecer os mesmos antigénios restritos a HLA-A*0201 que os reconhecidos pelos CTLs humanos restritos a HLA-A*0201 (Engelhard *et al.*, *J Immunol* 1991, 146:1226-1232; Shirai *et al.*, *J Immunol* 1995, 154:2733-2742). Por isso, a utilização de ratinhos transgénicos HLA pode superar as limitações da rejeição do tumor restrito a H-2. Contudo, nenhum modelo de tumor HPV estava disponível para testar a resposta antitumoral restrita a HLA-A*0201. Aqui, é apresentado o primeiro modelo de tumor HPV16 para ratinhos transgénicos HLA-A*0201 (igualmente descrito em Eiben GL *et al.*, *Cancer Research*, 15 de outubro de 2002, 62, N.º 20). A imunogenicidade das fusões E6/E7 foi testada neste modelo.

Este modelo de tumor foi desenvolvido através da transfeção de fibroblastos de ratinhos C57BL/6 transgênicos HLA-A 0201 com E6 e E7 HPV16 e Ras V12, gerando uma linha celular (HLF16) que é cancerígena nos ratinhos HLA-A 0201. O epítipo H-2Db dominante foi removido do gene E7 para garantir que as respostas antitumorais são independentes do epítipo 49-57 e provavelmente mediadas através de HLA-A*0201.

O conjunto de construções TetM foi utilizado no modelo de tumor HLF. Estas construções continham apenas quatro mutações: C63G e C106G em E6; C24G e E26G em E7. A mutação C91 G em E7 (presente nas construções PentM) foi eliminada porque é conhecida como sendo parte do epítipo HLA-A*0201 que abrange os aminoácidos 86 a 93 de E7 (Ressing *et al.*, *J Immunol* 1995, 154:5934-43; Ressing *et al.*, *Cancer Res* 1996, 56:582-8; Evans *et al.*, *Cancer Res* 1997, 57:2943-50). Ao utilizar um algoritmo de ligação de classe II (www.imtech.res.in/raghava/propred), foi igualmente determinado que existe um epítipo previsível confuso para diversos haplotipos de classe II entre os aminoácidos 87 e 95 de E7. Uma vez que foi descoberto que as respostas imunitárias mediadas pela classe II eram necessárias para a eficácia terapêutica da composição imunogénica VPR no modelo de tumor C3, a hipótese consistia no facto de a mutação C91G presente nas construções de composições imunogénicas PentM poder interromper os epítipos humanos de classe II.

Materiais e Métodos

Construção e caracterização do modelo de tumor HLF16.

A linha celular tumoral HLF16 provinha do tecido cardíaco/pulmonar dissecado de ratinhos C57BL/6 transgênicos HLA-A2 Dd. Após várias semanas na cultura, os fibroblastos aderentes foram transformados com um vetor bicistrónico pIRES que contém E6/E7 e H-ras ativado ao mesmo tempo que confere resistência à geneticina. O único

epítopo restrito a H-2b de Classe I conhecido do produto de genes E749-57 HPV16 (Velders et al., *Cancer Res* 1997, 61:7861-7867) foi removido para garantir que o tumor não apresenta este epítopo E7 HPV16 imunodominante. Os transfetantes foram selecionados no G418 e expandidos clonalmente. Os clones individuais foram depois testados relativamente à expressão de HLA-A*0201 através de análise FACS. Os clones que mostraram a expressão de HLA-A*0201 mais alta foram subsequentemente testados relativamente à respetiva aptidão para formar colónias no ágar-ágar macio. O clone de fibroblastos cardíacos/pulmonares 16 (HLF16) mostrou um crescimento independente de ancoragem no ágar-ágar macio e foi escolhido para mais estudos. A expressão de E7 foi evidente no citoplasma e núcleo de HLF16 após a coloração por imunofluorescência com um anticorpo monoclonal anti-E7. Para determinar se a linha HLF16 formará de facto tumores nos ratinhos, os ratinhos transgénicos HLA-A*0201 foram injetados com concentrações diferentes de células tumorais e monitorizados durante 35 dias. Todos os ratinhos desenvolveram tumores, mas apenas os induzidos com a dose mais elevada, 2×10^6 de células HLF16, mantiveram um tumor com o decorrer do tempo. O tumor HLF16 surgiu aproximadamente no dia 5 e continuou a crescer progressivamente até atingir cerca de 12x12x12 mm no dia 35, momento no qual os ratinhos foram sacrificados. A construção e as características da linha celular tumoral HLF16 também são descritas em Eiben GL et al. (*Cancer Research*, 15 de outubro de 2002, 62, N.º 20).

Ensaio de ágar-ágar macio. A capacidade de crescimento independente de ancoragem foi determinada através da avaliação da eficácia de formação de colónias das células suspensas no ágar-ágar macio. As células de controlo e transformadas ($0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ e $0,1 \times 10^6$) foram semeadas em 5 ml de 0,3% de ágar-ágar sobrejacente e adicionadas a placas de 10 mm revestidas com 20 ml de 0,6%

de ágar-ágar subjacente. As placas secaram e foram incubadas aos 37 °C. As colônias foram contadas 3 semanas após a colocação nas placas.

Consulte também: Ratinhos e Linhas celulares, Proteção contra Tumores e Experiências Terapêuticas e Análises por *Western blot* e Imunofluorescência (acima).

Resultados

As construções TetM foram verificadas relativamente à expressão através de *Western blot* e imunofluorescência de células infectadas com BHK. Ambas as proteínas E6E7 e E7E6 TetM migraram com cerca de 30 kDa em SDS-PAGE e tinham uma localização perinuclear difusa muito semelhante às construções PentM.

Ambas as construções de composições imunogénicas PentM e TetM foram analisadas relativamente à respetiva eficácia terapêutica contra tumores no modelo de tumor HLF (Figura 7). Os ratinhos transgênicos foram induzidos com 2×10^6 de células HLF16 subcutaneamente, e nos dias 5, 10 e 15 após a indução os ratinhos foram imunizados com VRPs GFP, VRPs TetM ou VRPs PentM. A rejeição completa do tumor resultou da imunização com VRPs E7E6 TetM, enquanto as VRPs E7E6 PentM e VRPs E6E7 PentM induziram a regressão do tumor de 90% dos ratinhos, exceto E6E7 TetM (Figura 7). Estes resultados demonstram que a imunização terapêutica com diversas das VRPs testadas aqui resultou num grau elevado de eficácia antitumoral independente das contribuições através das células T específicas para E7₄₉₋₅₇. Além disso, estes resultados demonstram que as fusões em que E6 é o carboxi-terminal para E7 (fusões E7E6) fornecem uma maior proteção imunitária do que os respetivos equivalentes em que E6 se encontra no amino-terminal (fusões E6E7).

A partir dos dados de eficácia terapêutica coletiva (Figuras 6 e 7) nos modelos de tumor C3 e HLF16, é possível concluir que as VRPs que codificam formas mutantes de E6 e E7 HPV16, sem quaisquer proteínas, citocinas ou adjuvantes

auxiliares, são altamente eficazes na erradicação de tumores murinos estabelecidos.

Exemplo 5: AS VRPS DE EXPRESSÃO DE E6 E E7 MUTANTES NÃO INDUZEM A DEGRADAÇÃO DE P53 E RB.

Os níveis de estado estável de p53 e Rb em MECs humanas primárias foram avaliados a seguir à infecção com VRPs que expressam E6 e E7 HPV16 de tipo selvagem, como proteínas de fusão ou individuais, proteína de fusão E7E6 TetM ou GFP como um controlo negativo.

Materiais e Métodos

Deteção de p53 e Rb. As células epiteliais mamárias humanas primárias (MEC, Clonetics, San Diego, CA) foram infetadas com VRPs que codificam formas de E6 e E7 de tipo selvagem ou mutantes numa MOI = 10, e foram colhidas as proteínas celulares totais 16 a 20 horas depois. Para melhorar a deteção de p53, as células foram tratadas com 1,0 nM de actinomicina D (Sigma, St. Louis, MO). Vinte e cinco microgramas de proteína total foram carregados por pista, submetidos a eletroforese através de SDS-PAGE, e transferidos eletroforeticamente (*blotted*) para membranas PVDF. As análises por *Western blot* foram sondadas utilizando anticorpo anti-p53 (FL-393, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) ou anticorpo anti-Rb (Catálogo n.º 554136, BD Phanningen, San Diego, CA). Os níveis de tubulina foram monitorizados como controlos de carregamento através de sondagem com um anticorpo antitubulina (H-235, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA).

Resultados

Foi determinado se uma forma mutante das proteínas de fusão E6 e E7, quando expressa no contexto da infecção com VRP, iria inativar funcionalmente p53 e Rb em comparação com as versões de tipo selvagem destas proteínas. O E7E6 TetM foi selecionado porque demonstrou uma eficácia antitumoral elevada (Figuras 6 e 7) e continha um número mínimo de mutações.

As células epiteliais mamárias (MEC) humanas primárias foram infetadas com VRPs que codificam E6 HPV16 sozinho, E7 sozinho, E7E6 de tipo selvagem ou E7E6 TetM. Aproximadamente vinte e quatro horas após a infeção com uma MOI = 10 de cada uma destas VRPs, os lisados de células com quantidades equivalentes de proteína celular total foram submetidos a eletroforese através de SDS-PAGE, transferidos para membranas PVDF, e sondados com anticorpos específicos para p53 (Figura 8A), Rb (Figura 8B) e tubulina como um controlo de carregamento. Os resultados destas análises por *Western blot* são ilustrados nas Figuras 8A e 8B e são representativos de duas experiências independentes.

A MEC infetada com VRPs que codificam proteína de fusão E7E6 de tipo selvagem ou E6 sozinho continha níveis indetetáveis de p53 em oposição à MEC infetada com E7E6 TetM que continha níveis de p53 comparáveis com as amostras infetadas com GFP-VRP de controlo negativo (Figura 8A). A MEC infetada com VRPs que codificam proteína de fusão E7E6 de tipo selvagem ou E7 sozinho continha níveis indetetáveis de Rb em oposição à MEC infetada com VRPs E7E6 TetM ou GFP-VRPs (Figura 8B). A presença da proteína de fusão que contém E7 nas amostras infetadas com VRP E7E6 TetM e E7E6 de tipo selvagem foi verificada através de sondagem das pistas com um anticorpo monoclonal anti-E7 (Figuras 8A e B). Os resultados mostram que os níveis de p53 e Rb são grandemente reduzidos na MEC primária que expressa versões de tipo selvagem de E6 e E7 no contexto de uma infeção com VRP, mas são normais na MEC que expressa E7E6 TetM a seguir à infeção com VRP.

Resumindo, a infeção com VRP de MEC revelou níveis grandemente reduzidos de p53 e Rb em culturas com formas de tipo selvagem de E6 e E7, respetivamente; a simples fusão de E7 com E6 não foi suficiente para reduzir a atividade das proteínas (Figuras 8A e B). Em oposição, a MEC infetada com VRPs E7E6 TetM com mutações E6 (^{63}C e ^{106}C) e E7 (^{24}C e

²⁶E) continha níveis normais de p53 e Rb (Figuras 8A e B), indicando que estas quatro mutações extinguiram a atividade oncogénica primária destas proteínas. Uma avaliação do potencial de imortalização de VRPs E7E6 TetM revelou que a MEC morreu a seguir à infeção, o que é uma consequência esperada da expressão das proteínas não estruturais AV expressas através de replicões (Griffith *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.* 1997, 51:565-592) e ainda favorece a segurança deste vetor.

Muitas referências, incluindo patentes, pedidos de patente e várias publicações, são indicadas e abordadas na descrição desta invenção. A indicação e/ou abordagem dessas referências são fornecidas meramente para clarificar a descrição da presente invenção e não são nenhuma admissão de que alguma dessas referências corresponde ao “estado da técnica” da invenção aqui descrita.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Wyeth
Cassetti, Maria C.
Smith, Larry

<120> POLIPÉPTIDOS DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E
COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS

<130> 00630/200M137-W00

<150> US 60/415.929

<151> 03-10-2002

<160> 65

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 248

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 2

```

atgtttcagg acccacagga gcgacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gaggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgta      300
attaggtgta ttaactgtca aaagccactg tgctctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cgggtggaccg gtcgatgtat gtcttggtgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgcatggag atacacctac attgcatgaa      480
tatatgttag atttgcaacc agagacaact gatctctact gttatgagca attaaatgac      540
agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc      600
cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa      660
agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg      720
tgcccatct gttctcagaa accataa                                           747

```

<210> 3
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16
 <400> 4

```

atgtttcagg acccacagga ggcacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gagggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtaggtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgta      300
attaggtgta ttaacggta aaagccactg tgcctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cggtggaccg gtcgatgtat gtcttggtgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgcacggag atacacctac attgcatgaa      480
tatatgtag atttgcaacc agagacaact gatctctacg gttatgggca attaaatgac      540
agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc      600
cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa      660
agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg      720
tgccccatct gttctcagaa accataa      747

```

<210> 5
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16
 <400> 5

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

<210> 6
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 6

```

atgtttcagg acccacagga gcgaccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa      60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt      120
gaggatatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat      180
gctgtagggtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt      240
tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgta      300
attagggtgta ttaacggtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac      360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cggcggaccg gtcgatgtat gtcttggtgc      420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgcacggag atacacctac attgcacgaa      480
tatatgttag atttgcaccc agagacaact gatctctacg gttatgggca attaaatgac      540
agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc      600
cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa      660
agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg      720
ggcccatctt gttctcagaa accataa      747

```

<210> 7
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 8

```

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact    60
gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggg    120
ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag    180
tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa    240
gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accatttcag    300
gacccacagg agcgacccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata    360
catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgcgacg tgaggatatat    420
gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtatgt    480
gataaatggt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg    540
tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttgtt aattaggtgt    600
attaactgtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaa gacatctgga caaaaagcaa    660
agattccata atataagggg tcgggtggacc ggtcgatgta tgtcttggtg cagatcatca    720
agaacacgta gagaaacca gctgtaa                                     747

```

<210> 9
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 9

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

<210> 10
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 10

```

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgcaacc agagacaact    60
gatctctacg gttatgggca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt    120
ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag    180
tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa    240
gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accatttcag    300
gacccacagg agcgaccag aaagttaacca cagttatgca cagagctgca aacaactata    360
catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgogacg tgaggatatat    420
gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtaggt    480
gataaatggt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg    540

tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttggt aattaggtgt    600
attaacggtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa    660
agattccata atataagggg tcggtggacc ggtcgatgta tgtcttggtg cagatcatca    720
agaacacgta gagaaacca gctgtaa                                     747

```

<210> 11
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 12

```

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact    60
gatctctacg gttatgggca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt    120
ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag    180
tgtgactcta cgettcgggt gtgctgacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa    240
gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg ggcccatct gttctcagaa accatttcag    300
gacccacagg agcgaccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata    360
catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgcgacg tgaggatatat    420
gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtaggt    480
gataaatgtt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg    540
tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttgtt aattaggtgt    600
attaacggtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa    660
agattccata atataagggg tcggtggacc ggtcgatgta tgtcttggtg cagatcatca    720
agaacacgta gagaaacca gctgtaa                                         747

```

<210> 13
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 13

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

<210> 14

<211> 98

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Lys Pro

<210> 15

<211> 158

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 18

<400> 15

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

<210> 16

<211> 149

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 31

<400> 16

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

<210> 17

<211> 149

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 33

<400> 17

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

<210> 18

<211> 149

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 35

<400> 18

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

<210> 19

<211> 158

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 39

<400> 19

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

<210> 20

<211> 158

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 45

<400> 20

Met Ala Arg Phe Asp Asp Pro Lys Gln Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Val Ser Ile Ala Cys
20 25 30

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

Phe Lys Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Cys Ile Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Tyr Ser Asn Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Lys Ile Thr Asn Thr
85 90 95

Glu Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
100 105 110

Asn Pro Ala Glu Lys Arg Arg His Leu Lys Asp Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Ser Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Gly Gln Cys Asn Thr Cys Cys Asp Gln
130 135 140

Ala Arg Gln Glu Arg Leu Arg Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 21

<211> 151

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 51

<400> 21

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

Glu Ala Leu Asn Val Ser Met His Asn Ile Gln Val Val Cys Val Tyr
 20 25 30

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

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

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

Arg Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Ala Ile Thr Lys Lys Ser Leu
 85 90 95

Tyr Asp Leu Ser Ile Arg Cys His Arg Cys Gln Arg Pro Leu Gly Pro
 100 105 110

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

Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gln Cys Ala Asn Cys Trp Gln Arg Thr Arg
 130 135 140

Gln Arg Asn Glu Thr Gln Val
 145 150

<210> 22

<211> 148

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 52

<400> 22

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

<210> 23

<211> 155

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 56

<400> 23

Met Glu Pro Gln Phe Asn Asn Pro Gln Glu Arg Pro Arg Ser Leu His
 1 5 10 15

His Leu Ser Glu Val Leu Glu Ile Pro Leu Ile Asp Leu Arg Leu Ser
 20 25 30

Cys Val Tyr Cys Lys Lys Glu Leu Thr Arg Ala Glu Val Tyr Asn Phe
 35 40 45

Ala Cys Thr Glu Leu Lys Leu Val Tyr Arg Asp Asp Phe Pro Tyr Ala
 50 55 60

Val Cys Arg Val Cys Leu Leu Phe Tyr Ser Lys Val Arg Lys Tyr Arg
 65 70 75 80

Tyr Tyr Asp Tyr Ser Val Tyr Gly Ala Thr Leu Glu Ser Ile Thr Lys
 85 90 95

Lys Gln Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Tyr Arg Cys Gln Ser Pro
 100 105 110

Leu Thr Pro Glu Glu Lys Gln Leu His Cys Asp Arg Lys Arg Arg Phe
 115 120 125

His Leu Ile Ala His Gly Trp Thr Gly Ser Cys Leu Gly Cys Trp Arg
 130 135 140

Gln Thr Ser Arg Glu Pro Arg Glu Ser Thr Val
 145 150 155

<210> 24

<211> 149

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 58

<400> 24

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

Gln Ala Leu Glu Thr Ser Val His Glu Ile Glu Leu Lys Cys Val Glu
20 25 30

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

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

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

Tyr Ser Leu Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Gln Thr Leu Lys Lys Cys Leu
85 90 95

Asn Glu Ile Leu Ile Arg Cys Ile Ile Cys Gln Arg Pro Leu Cys Pro
100 105 110

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

Ser Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Ala Val Cys Trp Arg Pro Arg Arg
130 135 140

Arg Gln Thr Gln Val
145

<210> 25

<211> 160

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 59

<400> 25

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

<210> 26

<211> 158

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 68

<400> 26

```

Met Ala Leu Phe His Asn Pro Glu Glu Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1      5      10      15

Leu Cys Arg Thr Leu Asp Thr Thr Leu His Asp Val Thr Ile Asp Cys
20      25      30

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

Phe Ser Asp Leu Cys Val Val Tyr Arg Asp Gly Val Pro Phe Ala Ala
50      55      60

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

Tyr Ser Glu Ser Val Tyr Ala Thr Thr Leu Glu Thr Ile Thr Asn Thr
85      90      95

Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Met Ser Cys Leu Lys Pro Leu
100     105     110

Cys Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Thr Thr Lys Arg Arg Leu His
115     120     125

Lys Ile Ala Gly Asn Phe Thr Gly Gln Cys Arg His Cys Trp Thr Ser
130     135     140

Lys Arg Glu Asp Arg Arg Arg Ile Arg Gln Glu Thr Gln Val
145     150     155

```

<210> 27

<211> 105

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 18

<400> 27

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
 20 25 30

Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
 35 40 45

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
 50 55 60

Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Lys Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
 65 70 75 80

Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe
 85 90 95

Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
 100 105

<210> 28

<211> 98

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 31

<400> 28

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

Pro Glu Ala Thr Asp Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Pro Asp Ser Ser
20 25 30

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

Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Cys Lys Ser Thr
50 55 60

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

Glu Leu Leu Met Gly Ser Phe Gly Ile Val Cys Pro Asn Cys Ser Thr
85 90 95

Arg Leu

<210> 29

<211> 97

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 33

<400> 29

Met Arg Gly His Lys Pro Thr Leu Lys Glu Tyr Val Leu Asp Leu Tyr
1 5 10 15

Pro Glu Pro Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
20 25 30

Asp Glu Asp Glu Gly Leu Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Gln Pro Ala
35 40 45

Thr Ala Asp Tyr Tyr Ile Val Thr Cys Cys His Thr Cys Asn Thr Thr
50 55 60

Val Arg Leu Cys Val Asn Ser Thr Ala Ser Asp Leu Arg Thr Ile Gln
65 70 75 80

Gln Leu Leu Met Gly Thr Val Asn Ile Val Cys Pro Thr Cys Ala Gln
85 90 95

Gln

<210> 30
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 35
 <400> 30

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

Pro Glu Ala Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Cys Asp Ser Ser
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Ser Cys Cys Lys Cys Glu Ala
 50 55 60

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

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

Gln Arg Ala

<210> 31
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 39
 <400> 31

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

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 45

<400> 32

Met His Gly Pro Arg Glu Thr Leu Gln Glu Ile Val Leu His Leu Glu
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Leu Asp Pro Val Asp Leu Leu Cys Tyr Glu Gln Leu
 20 25 30

Ser Glu Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ala Asp Gly Val Ser His Ala
 35 40 45

Gln Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Lys Ile Leu Cys
 50 55 60

Val Cys Cys Lys Cys Asp Gly Arg Ile Glu Leu Thr Val Glu Ser Ser
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Leu Arg Thr Leu Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser
 85 90 95

Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Asn Gln
 100 105

<210> 33

<211> 101

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 51

<400> 33

Met Arg Gly Asn Val Pro Gln Leu Lys Asp Val Val Leu His Leu Thr
 1 5 10 15

Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu Gln Cys Tyr Glu Gln Phe Asp Ser Ser
 20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Val Asp Asn Met Arg Asp Gln Leu Pro Glu Arg
 35 40 45

Arg Ala Gly Gln Ala Thr Cys Tyr Arg Ile Glu Ala Pro Cys Cys Arg
 50 55 60

Cys Ser Ser Val Val Gln Leu Ala Val Glu Ser Ser Gly Asp Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Val Val Gln Gln Met Leu Met Gly Glu Leu Ser Leu Val Cys Pro
 85 90 95

Cys Cys Ala Asn Asn
 100

<210> 34
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 52
 <400> 34

```

Met Arg Gly Asp Lys Ala Thr Ile Lys Asp Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
1          5          10          15

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

Asp Glu Glu Asp Thr Asp Gly Val Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Glu
          35          40          45

Gln Ala Thr Ser Asn Tyr Tyr Ile Val Thr Tyr Cys His Ser Cys Asp
50          55          60

Ser Thr Leu Arg Leu Cys Ile His Ser Thr Ala Thr Asp Leu Arg Thr
65          70          75          80

Leu Gln Gln Met Leu Leu Gly Thr Leu Gln Val Val Cys Pro Gly Cys
          85          90          95

Ala Arg Leu
  
```

<210> 35
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 56
 <400> 35

```

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

Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu Gln Cys Asn Glu Gln Leu Asp Ser Ser
          20          25          30

Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Val Asp His Leu Gln Glu Arg Pro Gln
          35          40          45

Gln Ala Arg Gln Ala Lys Gln His Thr Cys Tyr Leu Ile His Val Pro
          50          55          60

Cys Cys Glu Cys Lys Phe Val Val Gln Leu Asp Ile Gln Ser Thr Lys
65          70          75          80

Glu Asp Leu Arg Val Val Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val
          85          90          95

Thr Cys Pro Leu Cys Ala Ser Ser Asn
          100          105

```

<210> 36
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 58
 <400> 36

```

Met Arg Gly Asn Asn Pro Thr Leu Arg Glu Tyr Ile Leu Asp Leu His
1          5          10          15

Pro Glu Pro Thr Asp Leu Phe Cys Tyr Glu Gln Leu Cys Asp Ser Ser
          20          25          30

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

Ala Thr Ala Asn Tyr Tyr Ile Val Thr Cys Cys Tyr Thr Cys Gly Thr
          50          55          60

Thr Val Arg Leu Cys Ile Asn Ser Thr Thr Thr Asp Val Arg Thr Leu
65          70          75          80

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

Gln Gln

```

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 59
 <400> 37

```

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

Pro Gln Asn Tyr Glu Glu Val Asp Leu Val Cys Tyr Glu Gln Leu Pro
          20          25          30

Asp Ser Asp Ser Glu Asn Glu Lys Asp Glu Pro Asp Gly Val Asn His
          35          40          45

Pro Leu Leu Leu Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Asn Ile Val
50          55          60

Cys Val Cys Cys Lys Cys Asn Asn Gln Leu Gln Leu Val Val Glu Thr
65          70          75          80

Ser Gln Asp Gly Leu Arg Ala Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp Thr Leu
          85          90          95

Ser Phe Val Cys Pro Leu Cys Ala Ala Asn Gln
          100          105

```

<210> 38
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Vírus do papiloma humano tipo 68
 <400> 38

```

Met His Gly Pro Lys Pro Thr Val Gln Glu Ile Val Leu Glu Leu Cys
1      5      10      15

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

Gly Asp Ser Asp Asp Glu Ile Asp Glu Pro Asp His Ala Val Asn His
      35      40      45

His Gln His Leu Leu Leu Ala Arg Arg Asp Glu Gln Gln Arg His Arg
50      55      60

Ile Gln Cys Leu Cys Cys Lys Cys Asn Lys Ala Leu Gln Leu Val Val
65      70      75      80

Glu Ala Ser Arg Asp Asn Leu Arg Thr Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp
      85      90      95

Ser Leu Asn Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Glu Thr Gln
      100      105      110

```

<210> 39

<211> 152

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(152)

<223> em que Xaa corresponde a qualquer aminoácido

<400> 39

```

Xaa Xaa Xaa Phe Glx Asp Pro Xaa Glu Arg Pro Xaa Lys Leu Xaa Asp
1      5      10      15

Leu Cys Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa His Asx Ile Xaa Xaa Xaa Cys
20      25      30

Val Tyr Cys Lys Xaa Glx Leu Glx Arg Xaa Glu Val Tyr Xaa Phe Ala
35      40      45

Phe Xaa Asp Leu Xaa Ile Val Tyr Arg Asp Xaa Xaa Pro Xaa Ala Xaa
50      55      60

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

Tyr Xaa Xaa Ser Val Tyr Gly Xaa Thr Leu Glu Xaa Xaa Thr Xaa Lys
85      90      95

Xaa Leu Xaa Asx Leu Leu Ile Arg Cys Xaa Xaa Cys Gln Xaa Pro Leu
100     105     110

Cys Pro Xaa Glu Lys Xaa Arg His Xaa Asx Xaa Lys Xaa Arg Phe His
115     120     125

Asn Ile Xaa Gly Xaa Trp Thr Gly Xaa Cys Xaa Xaa Cys Trp Xaa Xaa
130     135     140

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145     150

```

<210> 40

<211> 104

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(104)

<223> em que Xaa corresponde a qualquer aminoácido

<400> 40

Met Xaa Gly Xaa Xaa Pro Thr Leu Xaa Xaa Xaa Val Leu Asp Leu Xaa
 1 5 10 15

Pro Glx Xaa Xaa Xaa Asp Leu Xaa Cys Tyr Glu Gln Leu Xaa Asp Ser
 20 25 30

Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Cys
 50 55 60

Cys Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Val Glx Ser Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Asp Leu Arg Xaa Leu Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Leu Xaa Xaa Val
 85 90 95

Cys Pro Xaa Cys Ala Xaa Xaa Xaa
 100

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus do papiloma humano tipo 16

<400> 41

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5

<210> 42

<211> 477

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 18

<400> 42

```

atggcgcgct ttgaggatcc aacacggcga ccctacaagc tacctgatct gtgcacggaa    60
ctgaacacctt cactgcaaga catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa    120
cttacagagg tatttgaatt tgcattttaa gatttatttg tgggttatag agacagtata    180
cccatgctg catgccataa atgtatagat ttttattcta gaattagaga attaagacat    240
tattcagact ctgtgtatgg agacacattg gaaaaactaa ctaacactgg gttatacaat    300
ttattaataa ggtgcctgcg gtgccagaaa ccgttgaatc cagcagaaaa acttagacac    360
cttaatgaaa aacgacgatt tcacaacata gctgggcact atagaggcca gtgccattcg    420
tgctgcaacc gagcacgaca ggaacgactc caacgacgca gagaaacaca agtataa    477

```

<210> 43

<211> 474

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 31

<400> 43

```

atgttcaaaa atcctgcaga aagacctcgg aaattgcatg aactaagctc ggcattggaa    60
ataccctacg atgaactaag attgaattgt gtctactgca aaggtcagtt aacagaaaca    120
gaggtattag attttgcatt tacagattta acaatagtat atagggacga cacaccacac    180
ggagtgtgta caaaatgttt aagattttat tcaaaagtaa gtgaatttag atggtataga    240

tatagtgtgt atggaacaac attagaaaaa trgacaaaca aaggatatatg tgatttgta    300
attaggtgta taaçgtgtca aagaccgttg tgtccagaag aaaaacaaag acatttggat    360
aaaaagaaac gattccacaa cataggagga aggtggacag gacgttgcac agcatgttgg    420
agaagacctc gtactgaaac ccaagtgtaa acatgcgtgg agaaacacct acgt    474

```

<210> 44

<211> 450

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 33

<400> 44

```

atgtttcaag aactgagga aaaaccacga acattgcatg atttgtgcca agcattggag      60
acaactatác acaacattga actacagtgc gtggaatgca aaaaaccttt gcaacgatct      120
gaggatatatg attttgcatt tgcagattta acagttgtat atagagaggg aaatccattt      180
ggaatatgta aactgtgttt gcggttctta tctaaaatta gtgaatatag acattataat      240
tattctgtat atggaaatac attagaacaa acagttaaaa aacctttaaa tgaaatatta      300
attaggtgta ttatatgtca aagacctttg tgtcctcaag aaaaaaacg acatgtggat      360
ttaaacaac gatttcataa tatttcgggt cggtgggacg ggcgctgtgc ggcgtgttgg      420
aggtcccgac gtagagaaac tgcactgtga                                     450

```

<210> 45

<211> 450

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 35

<400> 45

```

atgtttcagg acccagctga acgaccttac aaactgcatg atttgtgcaa cgaggtagaa      60
gaaagcatcc atgaaatttg tttgaattgt gtatactgca aacaagaatt acagcggagt      120
gaggatatatg actttgcatg ctatgatttg tgtatagtat atagagaagg ccagccatat      180
ggagtatgca tgaaatgttt aaaattttat tcaaaaataa gtgaatatag atggtataga      240
tatagtgtgt atggagaaac gttagaaaaa caatgcaaca aacagttatg tcatttatta      300
attaggtgta ttacatgtca aaaaccgctg tgtccagttg aaaagcaaag acatttagaa      360
gaaaaaaaaac gattccataa catcgggtgga cgggtggacag gtcgggtgtat gtctctgttgg      420
aaaccaacac gtagagaaac cgagggtgtaa                                     450

```

<210> 46

<211> 477

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 39

<400> 46

```

atggcgcgat ttcacaatcc tgcagaacgg ccatacaaat tgccagacct gtgcacaacg      60
ctggacacca ccttgcagga cattacaata gcctgtgtct attgcagacg accactacag      120
caaaccgagg tatatgaatt tgcatttagt gatttatatg tagtatatag ggacggggaa      180
ccactagctg catgccaatc atgtataaaa ttttatgcta aaatacggga gctacgatat      240
tactcggact cgggtgatgc aactacatta gaaaatataa ctaatacaaa gttatataat      300
ttattaataa ggtgcatgtg ttgtctgaaa ccgctgtgtc cagcagaaaa attaagacac      360
ctaaatagca aacgaagatt tcataaaata gcaggaagct atacaggaca gtgtcgacgg      420
tgctggacca caaaacggga ggaccgcaga ctaacacgaa gagaaaccca agtataa      477

```

<210> 47

<211> 477

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 45

<400> 47

```

atggcgcgct ttgacgatcc aaagcaacga ccctacaagc taccagattt gtgcacagaa      60
ttgaatacat cactacaaga cgtatctatt gcctgtgtat attgcaaagc aacattggaa      120
cgcacagagg tatatcaatt tgcttttaaa gatttatgta tagtgtatag agactgtata      180
gcatatgctg catgccataa atgtatagac ttttattcca gaattagaga attaagatat      240
tattcaaact ctgtatatgg agagacactg gaaaaaataa ctaatacaga gttgtataat      300
ttgttaataa ggtgcctgcg gtgccagaaa ccattgaacc cagcagaaaa acgtagacac      360
cttaaggaca aacgaagatt tcacagcata gctggacagt accgagggca gtgtaataca      420
tgttgtgacc aggcacggca agaaagactt cgcagacgta gggaaacaca agtatag      477

```

<210> 48

<211> 456

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 51

<400> 48

```

atgttcgaag acaagaggga aagaccacga acgctgcatg aattatgtga agctttgaac      60
gtttctatgc acaatatata ggtagtggtg gtgtattgta aaaaggaatt atgtagagca      120
gatgtatata atgtagcatt tactgaaatt aagattgtat atagggataa taatccatat      180
gcagtatgca aacaatgttt actgttttat tcaaaaatta gagagtatag acgttatagc      240
aggtctgtgt atggtactac attagaggca attactaaaa aaagcttata tgatttatcg      300
ataagggtgtc atagatgtca aagaccactt gggcctgaag aaaagcaaaa attgggtggac      360
gaaaaaaaaa ggttccatga aatagcggga cggtggacgg ggcaatgcgc taattgctgg      420
caacgtacac gacaacgtaa cgaaacccaa gtgttaa                                456

```

<210> 49

<211> 447

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 52

<400> 49

```

atgtttgagg atccagcaac acgaccccg g accctgcacg aattgtgtga ggtgctggaa      60

gaatcgggtgc atgaaataag gctgcagtgt gtgcagtgca aaaaagagct acaacgaaga      120
gagggtatata agtttctatt tacagattta cgaatagtat atagagacaa taatccatat      180
ggcgtgtgta ttatgtgcct acgcttttta tctaagataa gtgaatatag gcattatcaa      240
tattcactgt atgggaaaac attagaagag agggtaaaaa aaccattaag tgaaataact      300
attagatgta taatttgtca aacgccatta tgtcctgaag aaaaagaaag acatgttaat      360
gcaaacaagc gatttcataa tattatgggt cggtggacag ggcgctgttc agagtgttgg      420
agaccccgac ctgtgaccca agtgtaa                                447

```

<210> 50

<211> 465

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 56

<400> 50

```

atggagccac aattcaacaa tccacaggaa cgtccacgaa gcctgcacca cttgagtggag    60
gtattagaaa tacctttaat tgatcttaga ttatcatgtg tatattgcaa aaaagaacta    120
acacgtgctg aggtatataa ttttgcctgc actgaattaa aattagtgtg tagggatgat    180
tttcttatg cagtgtgcag agtatgttta ttgttttata gtaaagttag aaaatatagg    240
tattatgact attcagtgtg tggagctaca ctagaaagta taactaaaaa acagttatgt    300
gatttattaa taagggtgcta cagatgtcaa agtccgttaa ctccggagga aaagcaattg    360
cattgtgaca gaaaaagacg atttcatcta atagcacatg gttggaccgg gtcattgttg    420
gggtgctgga gacaaacatc tagagaacct agagaatcta cagta                      465

```

<210> 51

<211> 450

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 58

<400> 51

```

atgttccagg acgcagagga gaaaccacgg acattgcatg atttgtgtca ggcgttggag    60
acatctgtgc atgaaatcga attgaaatgc gttgaatgca aaaagacttt gcagcgatct    120
gaggtatatg actttgtatt tgcagattta agaatagtgt atagagatgg aaatccattt    180
gcagtatgta aagtgtgctt acgattgcta tctaaaaataa gtgagtatag acattataat    240
tattcgctat atggagacac attagaacaa acactaaaaa agtgttttaa tgaaatatta    300
attagatgta ttatttgtca aagaccattg tgtccacaag aaaaaaaaaag gcatgtggat    360
ttaaacaaaa ggtttcataa tatttcgggt cgttggacag ggcgctgtgc agtgtgttgg    420
agaccccgac gtagacaaac acaagtgtaa                      450

```

<210> 52

<211> 483

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 59

<400> 52

```

atggcacgct ttgaggatcc tacacaacga ccatacaaac tgccctgattt gagcacaaca      60
ttgaatatcc ctctgcatga tattcgcacg aattgtgtgt ttgcaaagg ggaactgcaa      120
gaaagagagg tatttgaatt tgcttttaaat gacttattta tagtgtatag agactgtaca      180
ccgtatgcag cgtgtctgaa atgcatttca ttttatgcaa gagtaagaga attaagatat      240
tatagagatt ccgtgtatgg agaaacatta gaggctgaaa ccaagacacc gttacatgag      300
ctgctgatac gctgttatag atgcctaaaa cctctatgtc caacagataa attaaagcat      360
ataactgaaa aaagaagatt ccataatata gctggaatat atacaggaca gtgtcgtggg      420
tgtcggaccc gagcaagaca cctaagacag caacgacaag cgcgtagtga aacactggtg      480
taa                                                                    483

```

<210> 53

<211> 477

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 68

<400> 53

```

atggcgctat ttcacaaccc tgaggaacgg ccatacaaat tgccagacct gtgcaggaca      60
ttggacacta cattgcatga cgttacaata gactgtgtct attgcagaag gcaactacaa      120
cggacagagg tatatgaatt tgcccttagt gacctatgtg tagtgtatag agacggggta      180
ccatttgctg catgccaatc atgtattaaa ttttatgcta aaatacggga actacgatat      240
tactcggaat cgggtgtatgc aactacatta gaaaccataa ctaatacaaa gttatataat      300
ttattgataa ggtgcatgag ttgcctgaaa ccattgtgtc cagcagaaaa actaaggcac      360
ctaacaacaa aacgaagatt acataaaaata gcaggaaact ttacaggaca gtgtcggcac      420
tgctggacca gtaagcgaga ggaccgcaga cgcatacgtc aagaacaca agtttaa      477

```

<210> 54

<211> 318

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 18

<400> 54

```

atgcatggac ctaaggcaac attgcaagac attgtattgc atttagagcc ccaaatgaa      60
attccgggtg accttctatg tcacgagcaa ttaagcgact cagaggaaga aaacgatgaa      120
atagatggag ttaatcatca acattttacca gcccgacgag ccgaaccaca acgtcacaca      180
atgttggtga tgtgttgtaa gtgtgaagcc agaattaagc tagtagtaga aagctcagca      240
gacgaccttc gagcattcca gcagctgttt ctgaacaccc tgcctttgtg gtgtccgtgg      300
tgtgcatccc agcagtaa                                     318

```

<210> 55

<211> 297

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 31

<400> 55

```

atgcgtggag aaacacctac gttgcaagac tatgtgttag atttgcaacc tgaggcaact      60
gacctccact gttatgagca attaccgac agctcagatg aggaggatgt catagacagt      120
ccagctggac aagcagaacc ggacacatcc aattacaata tcgttacctt ttgttgtcag      180
tgtaagtcta cacttcgttt gtgtgtacag agcacacaag tagatattcg catattgcaa      240
gagctgttaa tgggctcatt tggaatcgtg tgccccaact gttctactag actgtaa      297

```

<210> 56

<211> 294

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 33

<400> 56

```

atgagaggac acaagccaac gttaaaggaa tatgttttag atttatatcc tgaaccaact      60
gacctatact gctatgagca attaagtgac agctcagatg aggatgaagg cttggaccgg      120
ccagatggac aagcacaacc agccacagct gattactaca ttgtaacctg ttgtcacact      180
tgtaacaacca cagttcgttt atgtgtcaac agtacagcaa gtgacctacg aaccatacag      240
caactactta tgggcacagt gaatattgtg tgccctacct gtgcacaaca ataa      294

```

<210> 57

<211> 300

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 35

<400> 57

```

atgcatggag aaataactac attgcaagac tatgttttag atttgaacc cgaggcaact      60
gacctatact gttatgagca attgtgtgac agctcagagg aggaggaaga tactattgac      120
ggtccagctg gacaagcaaa accagacacc tccaattata atattgtaac gtcctgttgt      180
aaatgtgagg cgacactacg tctgtgtgta cagagcacac acattgacat acgtaaattg      240
gaagatttat taatgggcac atttgaata gtgtgccccg gctgttcaca gagagcataa      300

```

<210> 58

<211> 330

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 39

<400> 58

```

atgcggtggac caaagcccac cttgcaggaa attgtattag atttatgtcc ttacaatgaa      60
atacagccgg ttgaccttgt atgtcacgag caattaggag agtcagagga tgaaatagat      120
gaacccgacc atgcagttaa tcaccaacat caactactag ccagacggga tgaaccacag      180
cgtcacacaa tacagtgttc gtgttgtaag tgtaacaaca cactgcagct ggtagtagaa      240
gcctcacggg atactctgcg acaactacag cagctgttta tggactcact aggatttgtg      300
tgtccgtggt gtgcaactgc aaaccagtaa                                     330

```

<210> 59

<211> 321

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 45

<400> 59

```

atgcatggac cccgggaaac actgcaagaa attgtattgc atttgaacc tcagaatgaa      60
ttagatcctg ttgacctgtt gtgttacgag caattaagcg agtcagagga ggaaaacgat      120
gaagcagatg gagtagtca tgcacaacta ccagcccgac gagccgaacc acagcgtcac      180
aaaattttgt gtgtatgttg taagtgtgac ggcagaattg agcttacagt agagagctcg      240
gcagaggacc ttagaacact acagcagctg tttttgagca ccttgtcctt tgtgtgtccg      300
tggtgtgcaa ctaaccaata a                                           321

```

<210> 60

<211> 306

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 51

<400> 60

atgCGTggta atgtaccaca attaaaagat gtagtattgc atttaacacc acagactgaa	60
attgacttgc aatgctacga gcaatttgac agctcagagg aggaggatga agtagataat	120
atgCGtgacc agctaccaga aagacgggct ggacaggcta cgtgttacag aattgaagct	180
ccgtgttgca ggtgttcaag ttagtagaaa ctggcagtgg aaagcagtgg agacaccctt	240
cgcgttgtag agcagatgtt aatgggCGaa ctaagcctgg ttgcccgtg ttgtgcgaac	300
aactag	306

<210> 61

<211> 300

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 52

<400> 61

atgCGTggag acaaagcaac tataaaagat tatatattag atctgcaacc tgaaacaact	60
gacctacact gctatgagca attaggtgac agctcagatg aggaggatac agatgggtgtg	120
gacCGgccag atggacaagc agaacaagcc acaagcaatt actacattgt gacatattgt	180
cacagttgtg atagcacact acggctatgc attcatagca ctgcgacgga ccttcgtact	240
ctacagcaaa tgctgttggg cacattacaa gttgtgtgcc cgggctgtgc acggctataa	300

<210> 62

<211> 318

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 56

<400> 62

atgcatggta aagtaccaac gctgcaagac gttgtattag aactaacacc tcaaacagaa	60
attgacctac agtgcaatga gcaattggac agctcagagg atgaggatga ggatgaagta	120
gaccatttgc aggagcggcc acagcaagct agacaageta aacaacatac gtgttaccta	180
atacacgtac cttgtttgtga gtgtaagttt gtggtgcagt tggacattca gagtacaaa	240
gaggacctgc gtgttgtaga acagctgctt atgggtgcgt taacagtaac gtgcccactc	300
tgCGcatcaa gtaactaa	318

<210> 63

<211> 297

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 58

<400> 63

```

atgagaggaa acaaccaaac gctaagagaa tatatttttag atttacatcc tgaaccaact      60
gacctattct gctatgagca attatgtgac agctcagacg aggatgaaat aggcttggac      120
gggccagatg gacaagcaca accggccaca gctaattact acattgtaac ttgttggttac      180
acttgtggca ccacggttcg tttgtgtatc aacagtacaa caaccgacgt acgaacccta      240
cagcagctgc ttatgggcac atgtaccatt gtgtgcccta gctgtgcaca gcaataa      297

```

<210> 64

<211> 324

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 59

<400> 64

```

atgcatggac caaaagcaac actttgtgac attgttttag atttggaacc aaaaaattat      60
gaggaagttg accttgtgtg ctacgagcaa ttacctgact ccgactccga gaatgaaaaa      120
gatgaaccag atggagttaa tcctcctttg ctactagcta gacgagctga accacagcgt      180
cacaacattg tgtgtgtgtg ttgtaagtgt aataatcaac ttcagctagt agtagaaacc      240
tcgcaagacg gattgcgagc cttacagcag ctgtttatgg acacactatc ctttgtgtgt      300
cctttgtgtg cagcaaacca gtaa      324

```

<210> 65

<211> 333

<212> ADN

<213> Vírus do papiloma humano tipo 68

<400> 65

```

atgcatggac caaagccac cgtgcaggaa attgtgttag agctatgtcc atacaatgaa      60
atacagccgg ttgaccttgt atgtcacgag caattaggag attcagacga tgaaatagat      120
gaaccgcacc atgcagttaa tcaccaccaa catctactac tagccagacg ggacgaacaa      180
cagcgtcaca gaattcagtg tctgtgttgt aagtgtacaa aggcactgca actagtagta      240
gaagcgtcgc gggacaacct ggcggacacta caacagctgt ttatggactc actaaatttt      300
gtgtgtccgt ggtgtgcaac tgaaaccag taa      333

```

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9910375 A [0009]
- US 6004557 A [0010]
- US 4554101 A [0064] [0065]
- US 5091309 A [0092]
- US 5217879 A [0092]
- US 5185440 A [0092]
- WO 9210578 A [0092]
- WO 9421792 A [0092]
- WO 9527069 A [0092]
- WO 9527044 A [0092]
- WO 9507994 A [0092]
- US 6228621 B [0092]
- WO 9528494 A [0093]
- WO 9518863 A [0097]
- WO 9617823 A [0097]
- US 5459127 A [0097]
- WO 9521931 A [0097]
- WO 9625508 A [0097]
- CA 2012311 [0098]
- US 5580859 A [0098]
- US 5589466 A [0098]
- US 6127170 A [0098]
- WO 9901157 A [0098]
- WO 9901158 A [0098]
- WO 9901175 A [0098]
- US 4912094 A [0104]

- US 6113918 A [0104]
- US 5057540 A [0105]
- US 6207646 B [0105]
- WO 0018434 A [0105]
- WO 9313302 A [0105]
- WO 9219265 A [0105]
- US 5078996 A [0105]
- US 5723127 A [0105]
- US 60415929 B [0167]

Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição

- **WALBOOMERS et al.** J. Path., 1999, vol. 189, 12-19 [0002]
- **KNEBEL et al.** Int J Cancer, 1992, vol. 51, 831-4 [0003]
- **CROOK et al.** Embo J, vol. 8, 513-9 [0003]
- **HE; HUANG.** Cancer Res., 1997, vol. 57, 3993-9 [0003]
- **SMOTKIN; WETTSTEIN.** Proc Natl Acad Sci USA, 1986, vol. 83, 4680-4 [0003]
- **DURST et al.** Virology, 1992, vol. 189, 132-40 [0003]
- **DYSON et al.** Science, 1989, vol. 243, 934-7 [0003]
- **COBRINIK et al.** Trends Biochem Sci, 1992, vol. 17, 312-5 [0003]
- **SCHEFFNER et al.** Cell, 1990, vol. 63, 1129-36 [0003]
- **NAKAGAWA et al.** J Infect Dis, 1997, vol. 175, 927-31 [0004]
- **KADISH et al.** J Natl Cancer Inst, 1997, vol. 89, 1285-93 [0004]
- **FELTKAMP et al.** Eur J Immunol, 1995, vol. 25, 2638-42 [0004] [0146]
- **LIN et al.** Cancer Res, 1996, vol. 56, 21-6 [0004] [0143] [0146]
- **EIBEN, G.L. et al.** Adv Can Res, 2002, vol. 86, 113-148 [0005]
- **VELDERS M.P. et al.** Cancer Res, vol. 61, 7861-7867 [0006]

- **RAYNER, J.O. et al.** Rev Med Virol, 2002, vol. 12, 279-296 [0006]
- **GRIFFITH, D.E. et al.** Annu. Rev. Microbiol., 1997, vol. 51, 565-592 [0006]
- **PUSHKO, P. et al.** Virology, 1997, vol. 239, 389-401 [0006]
- **BOURSNELL M. et al.** Vaccine, 1996, vol. 14 (16), 1485-1494 [0007]
- **BORYSIEWICZ LK et al.** Lancet, 1996, vol. 347 (9014), 1523-1527 [0008]
- **DALAL S et al.** Journal of Virology, 1996, vol. 70 (2), 683-688 [0011]
- **EDMONDS C et al.** Journal of virology, 1989, vol. 63 (6), 2650-2656 [0012]
- **VELDERS MP et al.** Cancer Research, 2001, vol. 61 (21), 7861-867 [0013]
- **KAST W et al.** Journal of Immunology, 1994, vol. 152 (8), 3904-3912 [0014]
- **MURAKAMI M et al.** Cancer Research, 1999, vol. 59 (6), 1184-187 [0015]
- **OFFRINGA et al.** Current Opinion in Immunology, 2000, vol. 12 (5), 576-582 [0016]
- **KAST, W.M. et al.** J Immunol, 1994, vol. 152, 3904-3912 [0030]
- **DALAL et al.** J Virol, 1996, vol. 70, 683-8 [0031] [0138]
- **Fields Virology.** Lippincott Williams and Wilkins, 2001, 2197-2265 [0042]
- **SAMBROOK; FITSCH ; MANIATIS.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0046]
- **DNA Cloning: A Practical Approach.** 1985, vol. I, II [0046]
- **Oligonucleotide Synthesis.** 1984 [0046]
- **Nucleic Acid Hybridization.** 1984 [0046]
- **Animal Cell Culture.** 1986 [0046]

- immobilized Cells and Enzymes. IRL Press, 1986 [0046]
- **B.E. PERBAL.** A Practical Guide to Molecular Cloning. 1984 [0046]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1994 [0046]
- Harrison's Principles of Internal Medicine. Mc- Graw-Hill, 2001 [0087]
- **MACDONALD, G.H. et al.** J Virol, 2000, vol. 74, 914-922 [0091]
- **MILLER ; ROSMAN.** BioTechniques, 1992, vol. 7, 980-990 [0094]
- **PUSHKO et al.** Virology, 1997, vol. 239, 389-401 [0095] [0127] [0128]
- **STRATFORD-PERRICAUDET et al.** J. Clin. Invest., 1992, vol. 90, 626-630 [0095]
- **LA SALLE et al.** Science, 1993, vol. 259, 988-990 [0095]
- **SAMULSKI et al.** J. Virol., vol. 61, 3096-3101 [0095]
- **SAMULSKI et al.** J. Virol., 1989, vol. 63, 3822-3828 [0095]
- **LEBKOWSKI et al.** Mol. Cell. Biol., 1988, vol. 8, 3988-3996 [0095]
- **FELGNER et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, vol. 84, 7413-7417 [0097]
- **FELGNER ; RINGOLD.** Science, 1989, vol. 337, 387-388 [0097]
- **MACKEY et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, vol. 85, 8027-8031 [0097]
- **ULMER et al.** Science, 1993, vol. 259, 1745-1748 [0097]
- **WU et al.** J. Biol. Chem., 1992, vol. 267, 963-967 [0098]
- **WU; WU.** J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, 14621-14624 [0098]
- **WILLIAMS et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 88, 2726-2730 [0098]
- **CURIEL et al.** Hum. Gene Ther., vol. 3, 147-154 [0098]
- **WU; WU.** J. Biol. Chem., 1987, vol. 262, 4429-4432 [0098]

- **MIR et al.** C.P. Acad. Sci., 1998, vol. 321, 893 [0098]
- **GAINER et al.** J. Neurooncol, 2000, vol. 47, 23-30 [0100]
- **KOIDE et al.** Jpn J. Pharmacol, 2000, vol. 83, 167-174 [0100]
- **KURIYAMA et al.** Gene Ther., 2000, vol. 7, 1132-1136 [0100]
- **YAMAUCHI et al.** J. Exp. Zool., 2000, vol. 287, 285-293 [0100]
- **HOOD et al.** Immunology. Benjamin/Cummings, 1984, 384 [0104]
- **HORTON et al.** Gene, 1989, vol. 77, 61-8 [0127]
- **GRIEDER, F.B. et al.** Virology, 1995, vol. 206, 994-1006 [0127]
- **VELDERS M.P. et al.** Cancer Res, 2001, vol. 61, 7861-7867 [0128]
- **GAO, Q. et al.** J Virol, 2001, vol. 75, 4459-4466 [0131]
- **DALAL et al.** J Virol, 1996, vol. 70, 683-688 [0131]
- **MUNGER, K et al.** Oncogene, 2001, vol. 20, 7888-7898 [0131]
- **SHI et al.** J Virol, 1999, vol. 73, 7877-81 [0138]
- **GAO et al.** J Virol, 2001, vol. 75, 4459-66 [0138]
- **EDMONDS; VOUSDEN.** J Virol, 1989, vol. 63, 2650-6 [0138]
- **RESSING et al.** J Immunol, 1995, vol. 154, 5934-43 [0138]
[0153]
- **RESSING et al.** Cancer Res, 1996, vol. 56, 582-8 [0138]
[0153]
- **EVANS et al.** Cancer Res, 1997, vol. 57, 2943-50 [0138]
[0153]
- **JEWERS et al.** J. Virol, 1992, vol. 66, 1329-1335 [0138]
- **RAMMENSEE et al.** Annu Rev Immunol, 1993, vol. 11, 213-44 [0138]
- **FELTKAMP, M.C.W. et al.** Eur J Immun, 1993, vol. 23, 2242-2249 [0142]
- **LIN, K.Y. et al.** Cancer Res, 1996, vol. 56, 21-26 [0142]
- **VELDERS et al.** Cancer Res, 2001, vol. 61, 7861-7 [0148]

- **RESSING et al.** J Immunol, 1995, vol. 154, 5934-5943
[0150]
- **ENGELHARD et al.** J Immunol, 1991, vol. 146, 1226-1232
[0151]
- **SHIRAI et al.** J Immunol, 1995, vol. 154, 2733-2742
[0151]
- **EIBEN GL et al.** Cancer Research, 15 October 2002, vol. 62 (20 [0151] [0154]
- **VELDERS et al.** Cancer Res, 1997, vol. 61, 7861-7867
[0154]
- **GRIFFITH et al.** Annu. Rev. Microbiol., 1997, vol. 51, 565-592 [0165]

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipéptido compreendendo polipéptidos E6 e E7 do vírus do papiloma humano, em que o polipéptido E7 antecede o polipéptido E6 e tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 24 e 26 da SEQ. ID N.º 14 e o polipéptido E6 tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 63 e 106 da SEQ. ID N.º 13.
2. O polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que o E7 tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 24, 26 e 91 da SEQ. ID N.º 14 e o polipéptido E6 tem mutações nos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 63 e 106 da SEQ. ID N.º 13.
3. O polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que os aminoácidos mutados sofreram uma mutação para glicina.
4. Um ácido nucleico isolado que codifica o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.
5. Uma célula hospedeira isolada que expressa o polipéptido de acordo com a reivindicação 1.
6. Uma composição imunogénica que compreende:
 - (a) o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e um veículo farmacologicamente aceitável, ou;
 - (b) o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4.
7. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 6 que compreende ainda um adjuvante.

8. Um vírus recombinante que compreende o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4.

9. O vírus recombinante de acordo com a reivindicação 8, em que o vírus é um vírus da encefalite equina venezuelana modificado.

10. Um polipéptido isolado de acordo com a reivindicação 1, que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ. ID N.º 9 ou SEQ. ID N.º 11.

11. Um ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 4, que codifica um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ. ID N.º 9 ou SEQ. ID N.º 11.

12. O ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 11, que tem a sequência de nucleótidos conforme apresentada na SEQ. ID N.º 10 ou SEQ. ID N.º 12.

13. Um vetor de expressão que compreende a sequência de ácidos nucleicos de acordo com as reivindicações 4, 11 ou 12 sob o controle de uma sequência de controle da expressão.

14. Uma célula hospedeira isolada que compreende o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4, ou o vetor de expressão de acordo com a reivindicação 13.

15. Utilização da composição imunogénica de acordo com a reivindicação 6 ou do vetor de expressão de acordo com a reivindicação 13 no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro do colo do útero.

16. Utilização da composição imunogénica de acordo com a reivindicação 6 ou do vetor de expressão de acordo com a

reivindicação 13 no fabrico de um medicamento para a prevenção do cancro do colo do útero.

Figura 1A

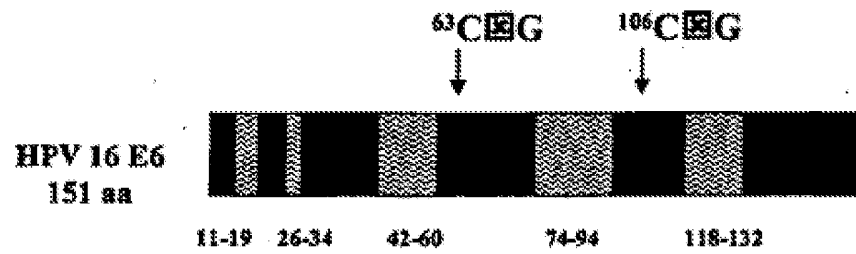
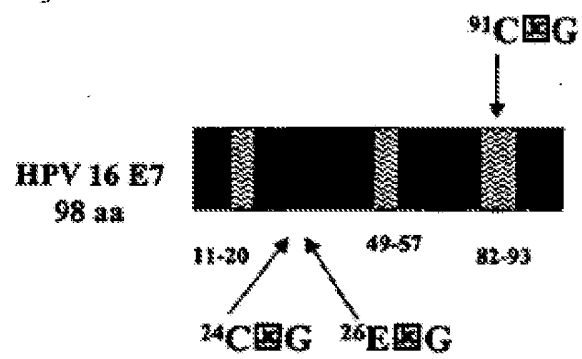


Figura 1B



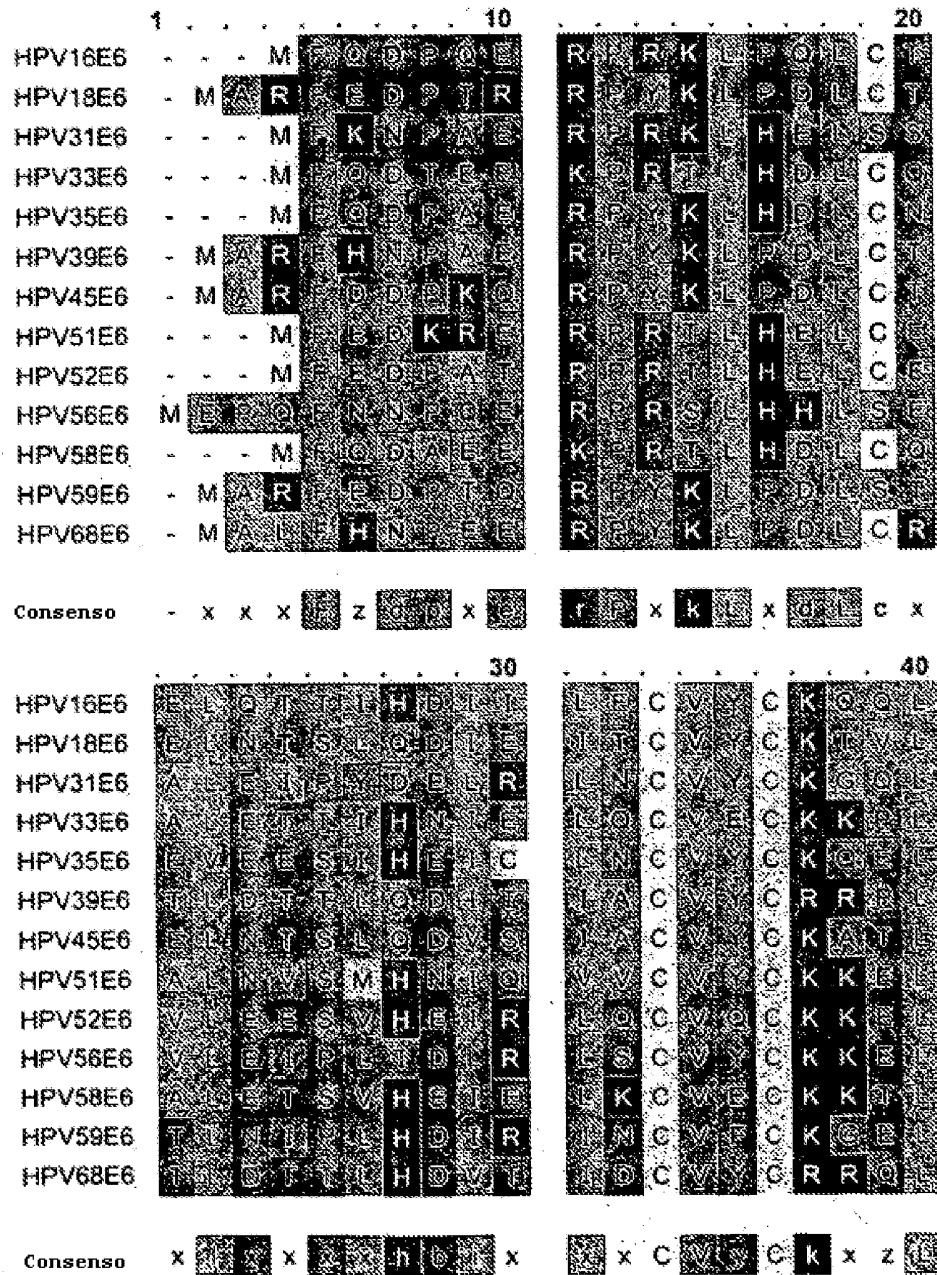


Figura 2A

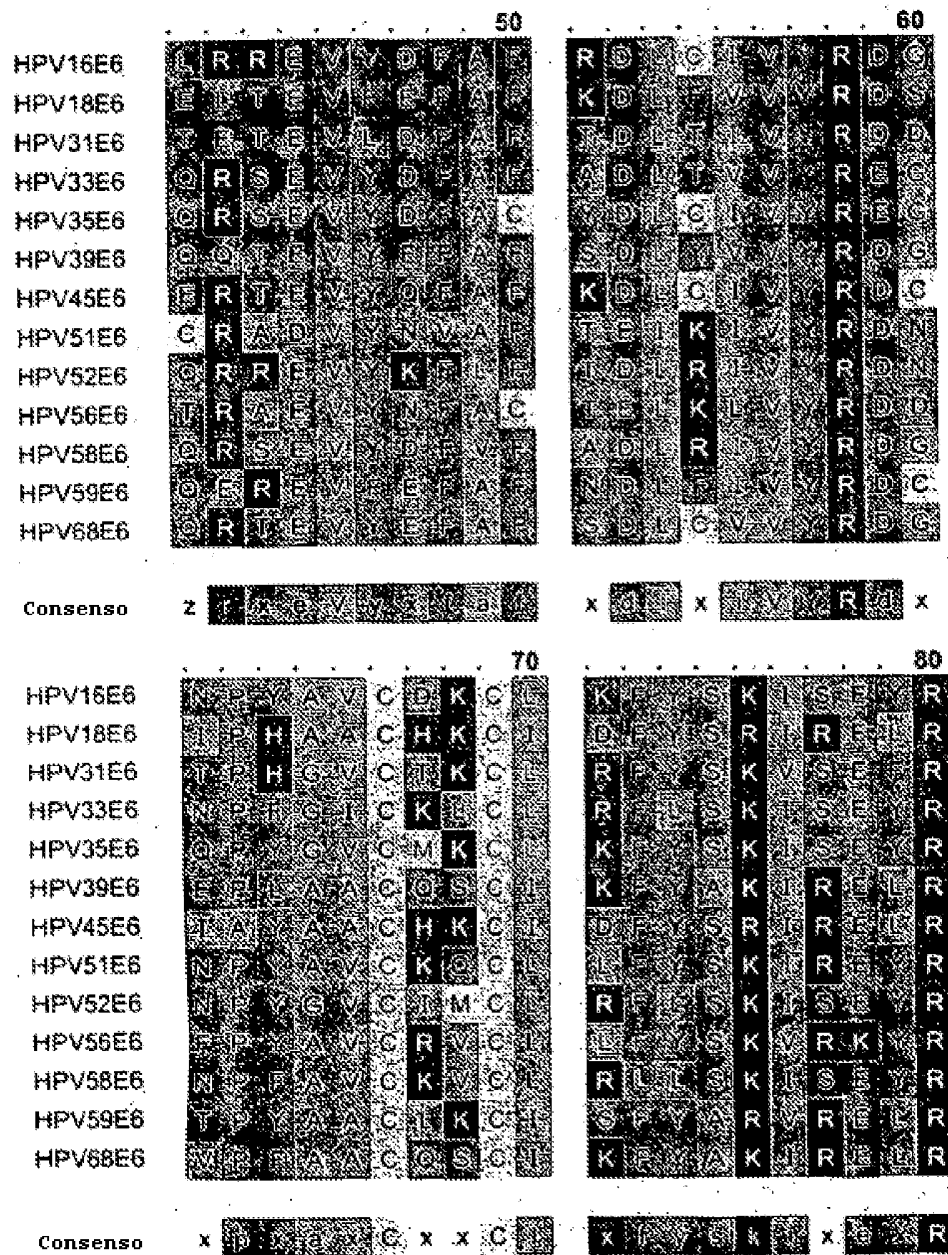


Figura 2B

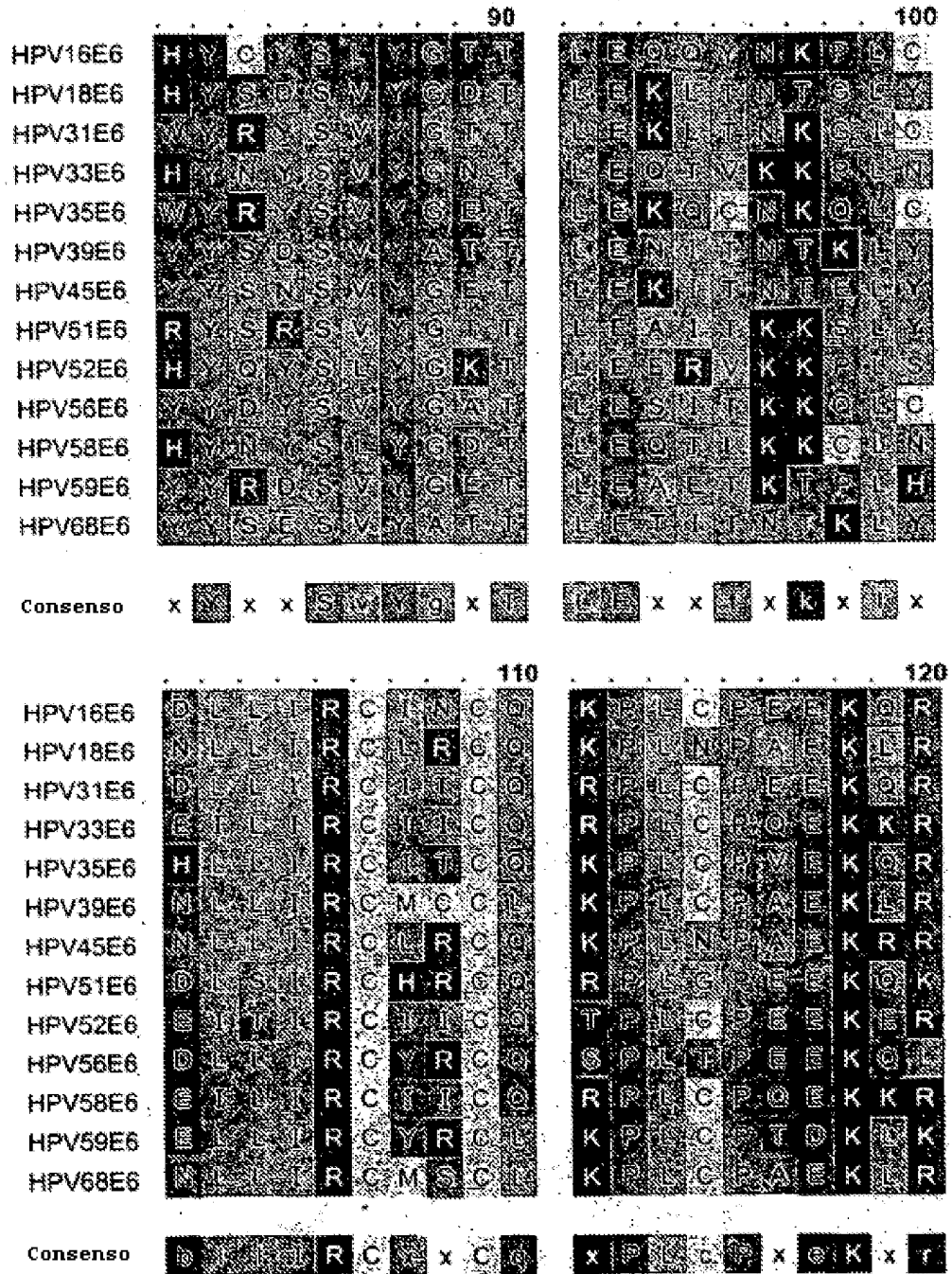


Figura 2C

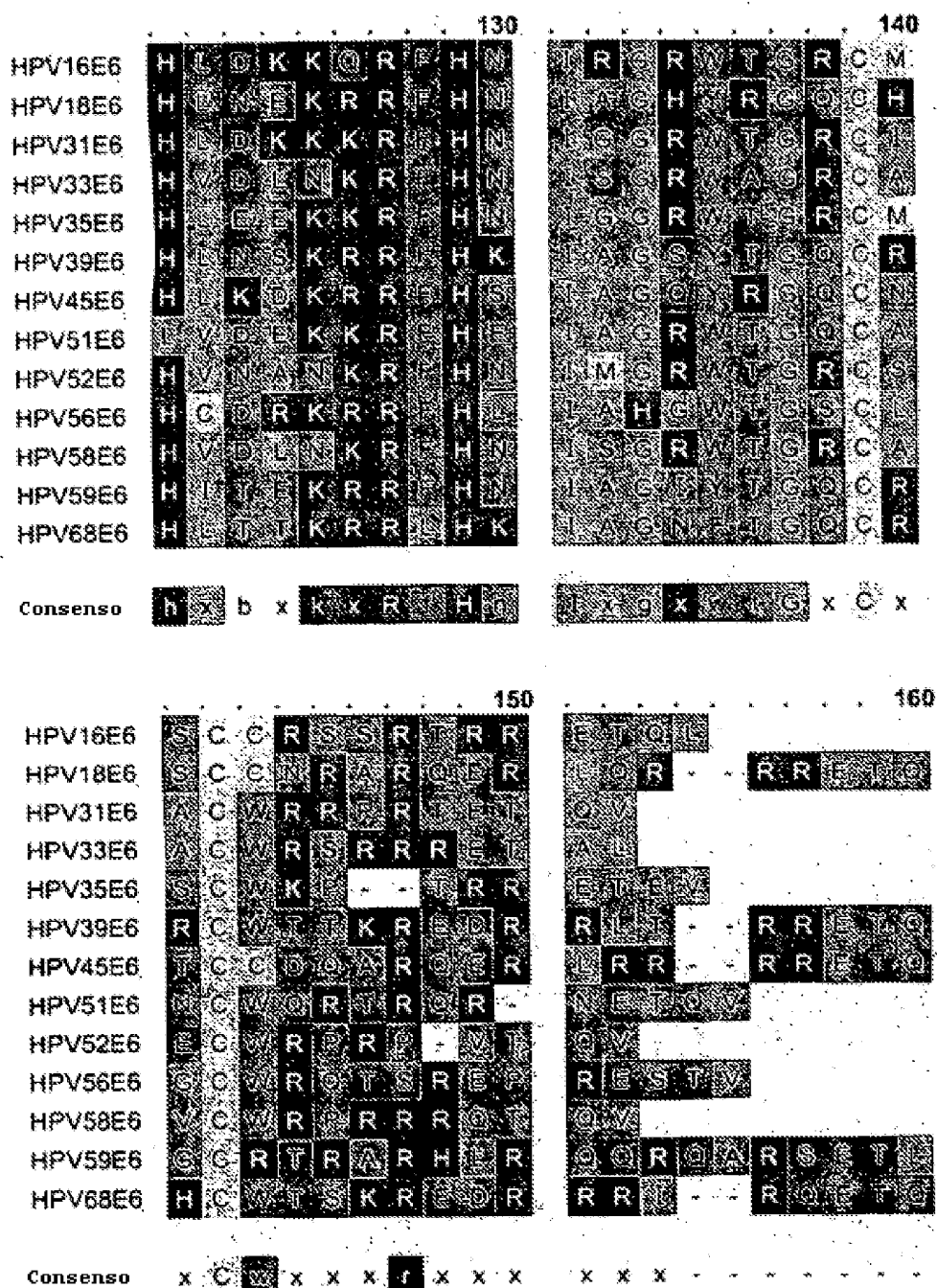


Figura 2D

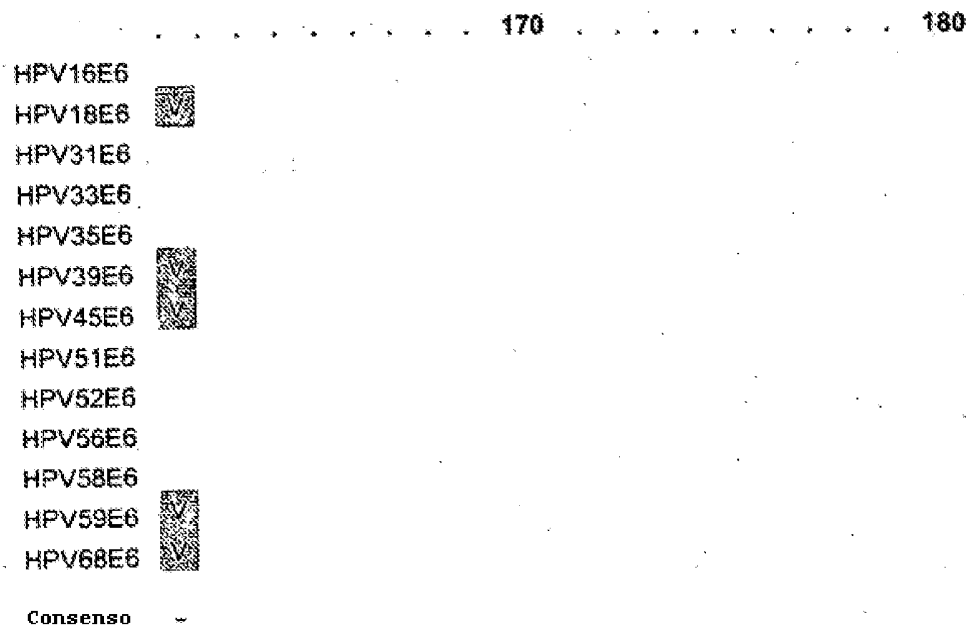


Figura 2E

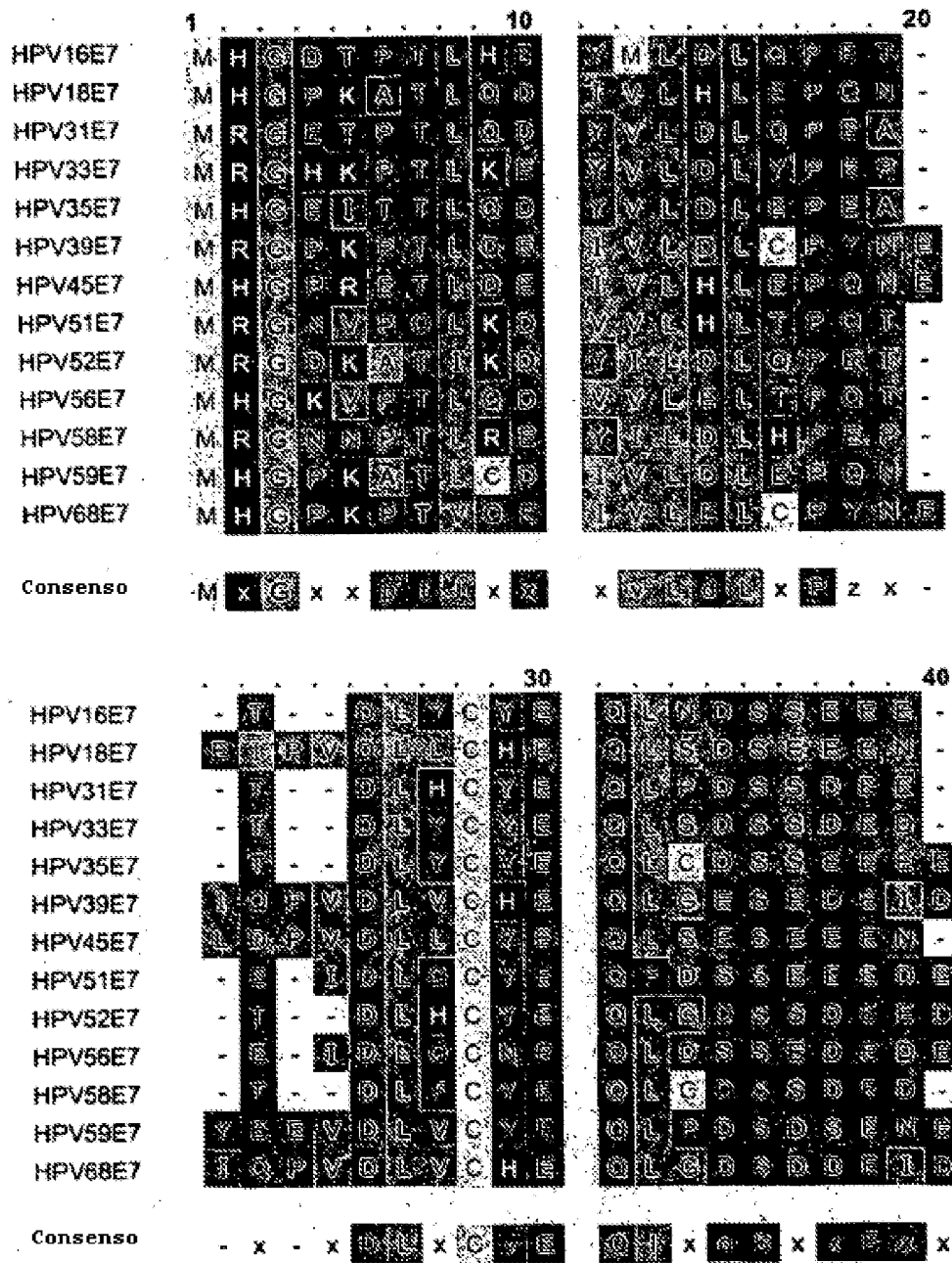


Figura 3A

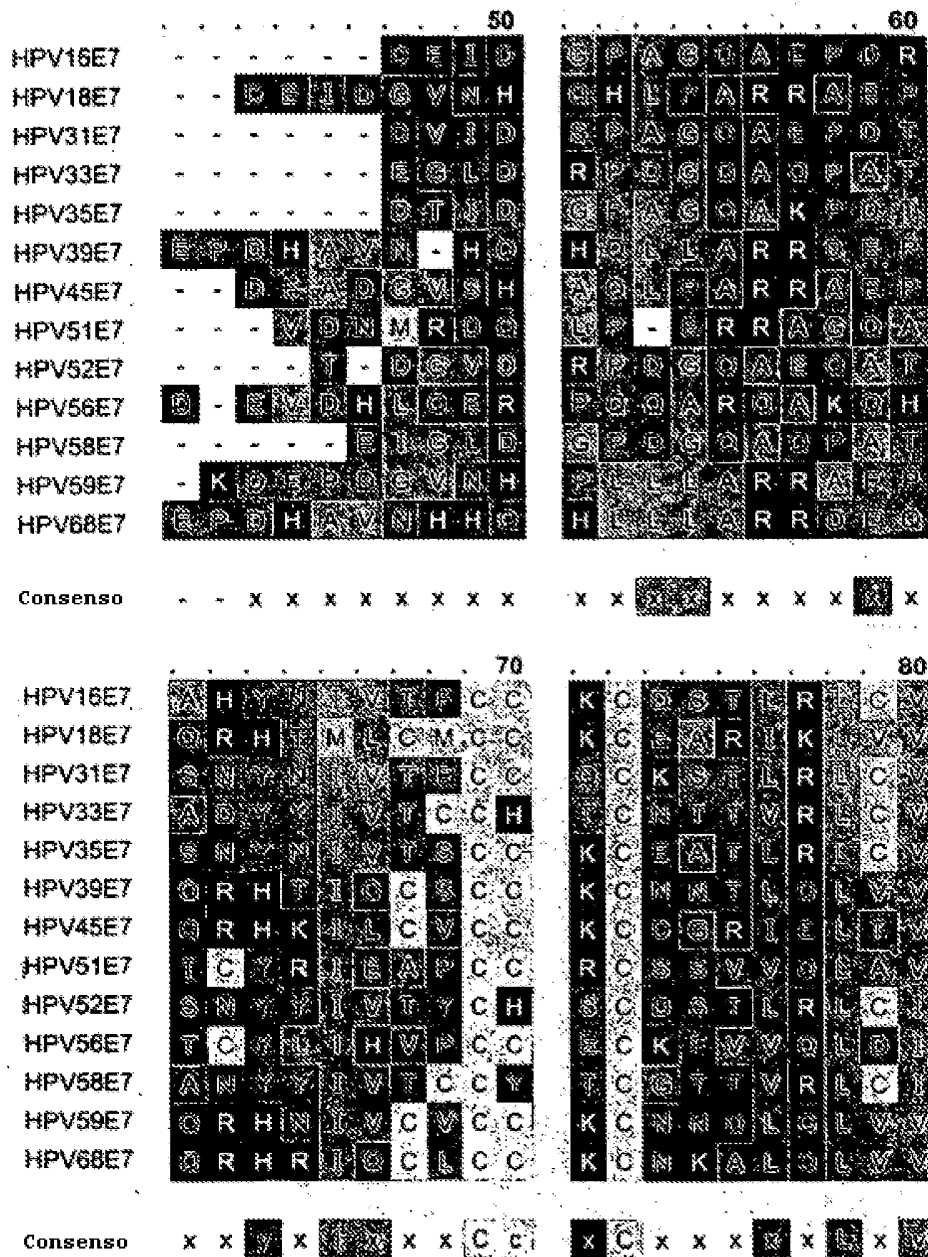


Figura 3B

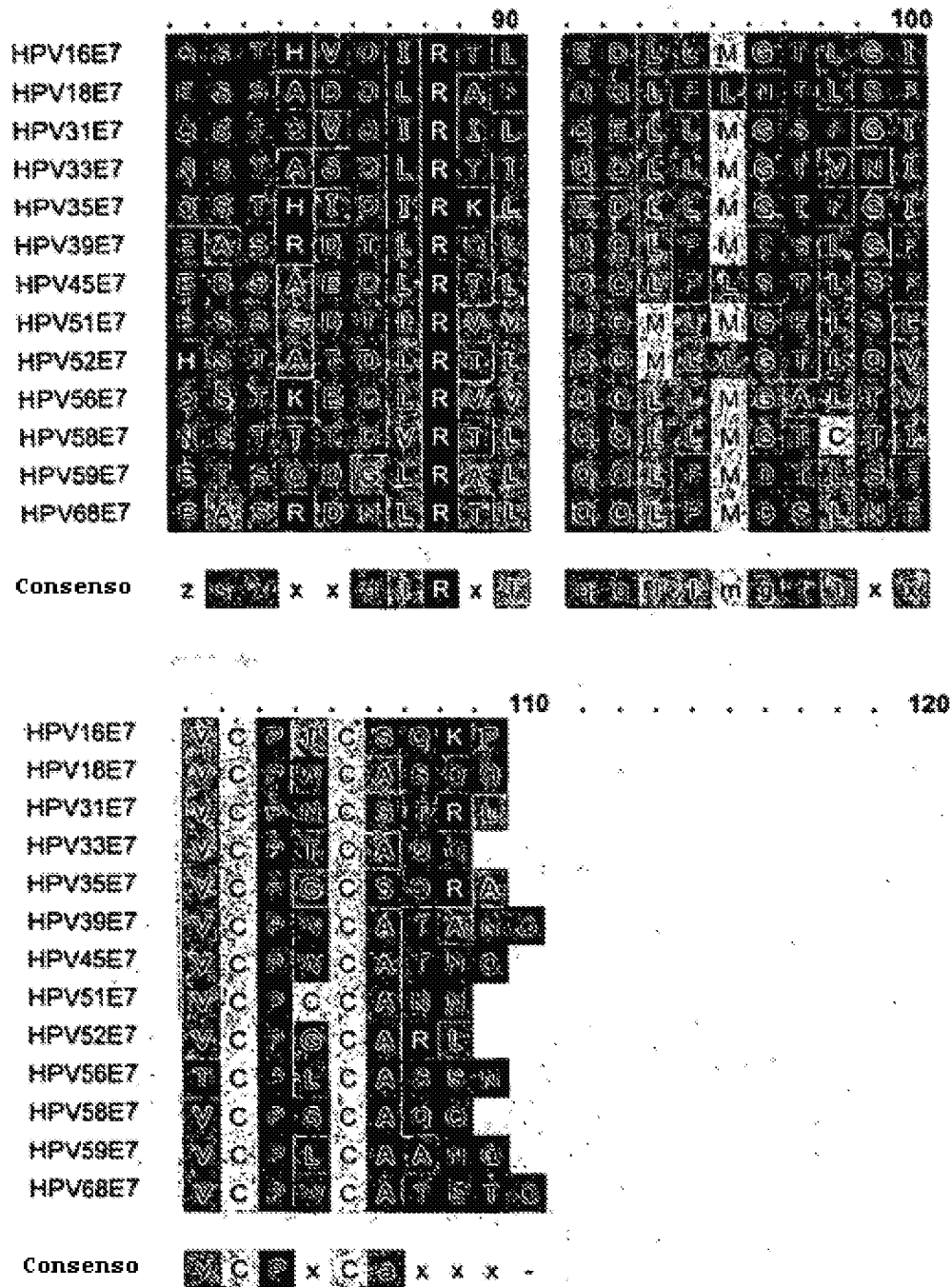


Figura 3C

Figura 4

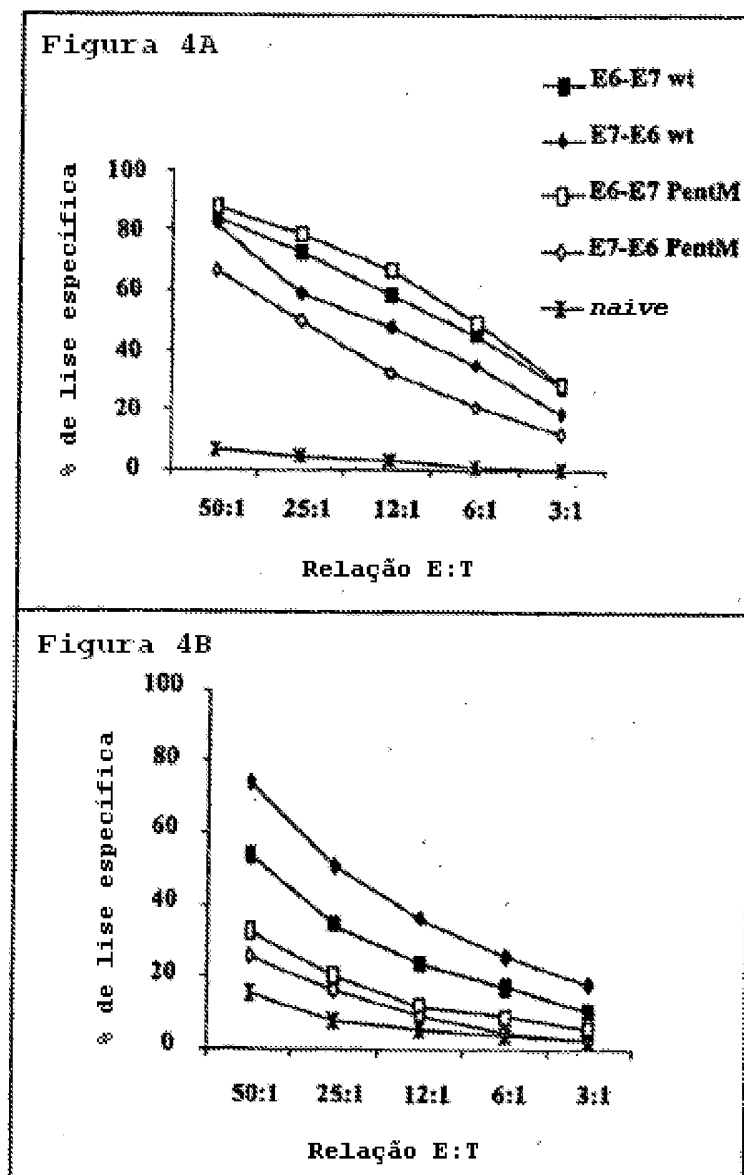


Figura 5

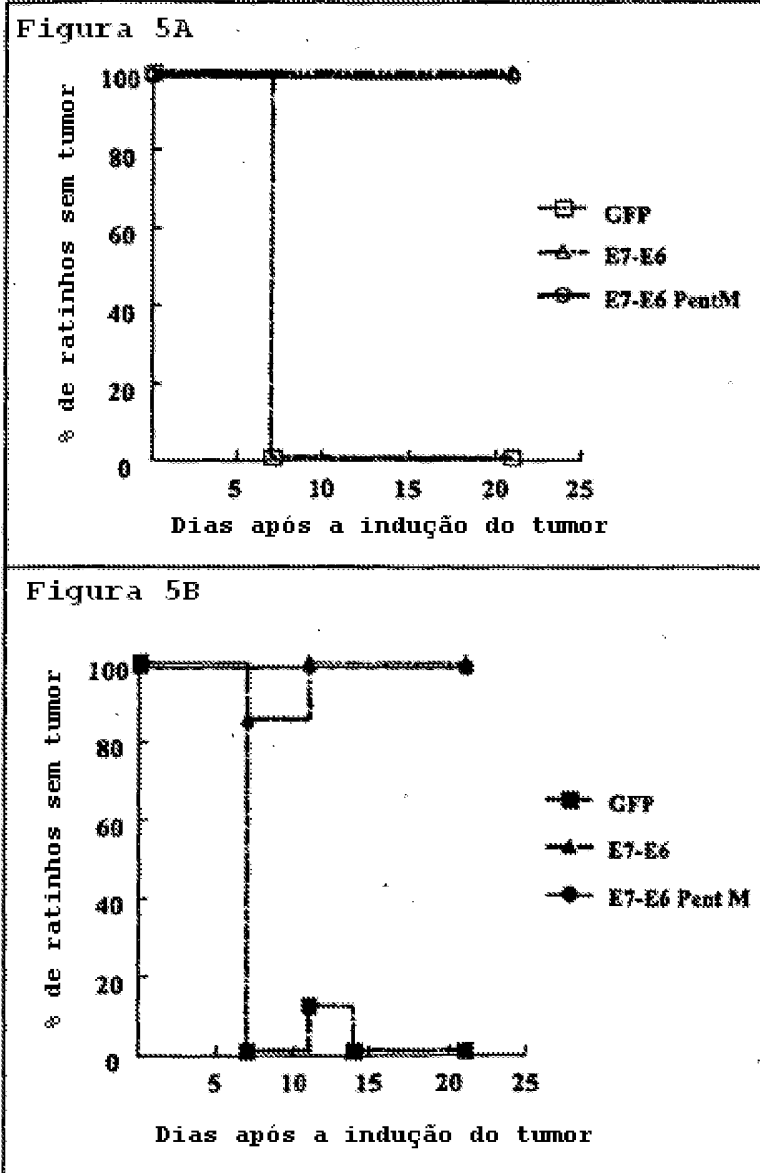


Figura 6

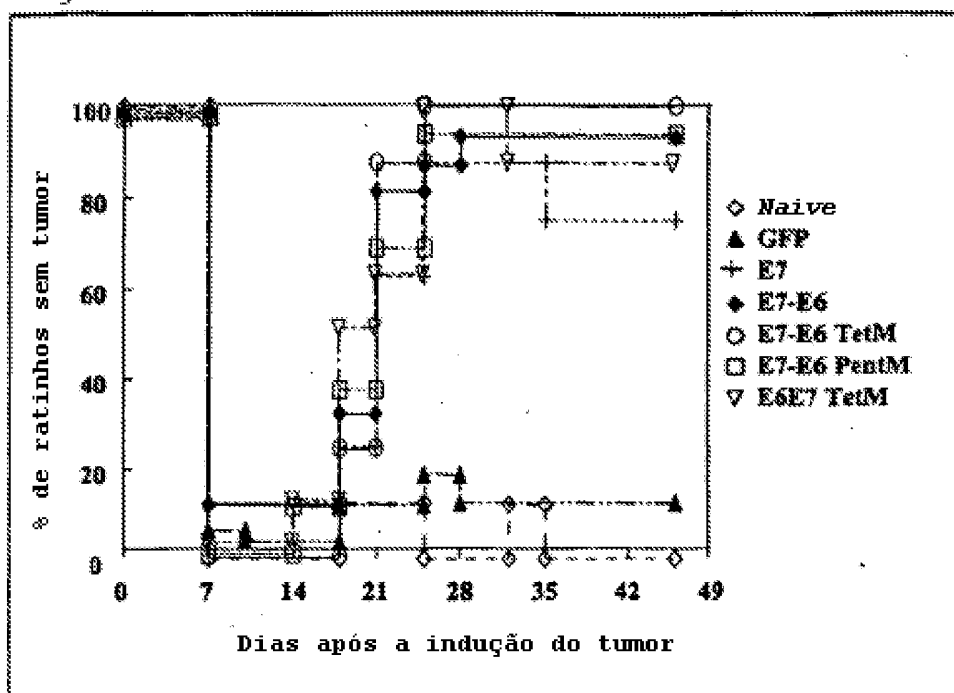


Figura 7

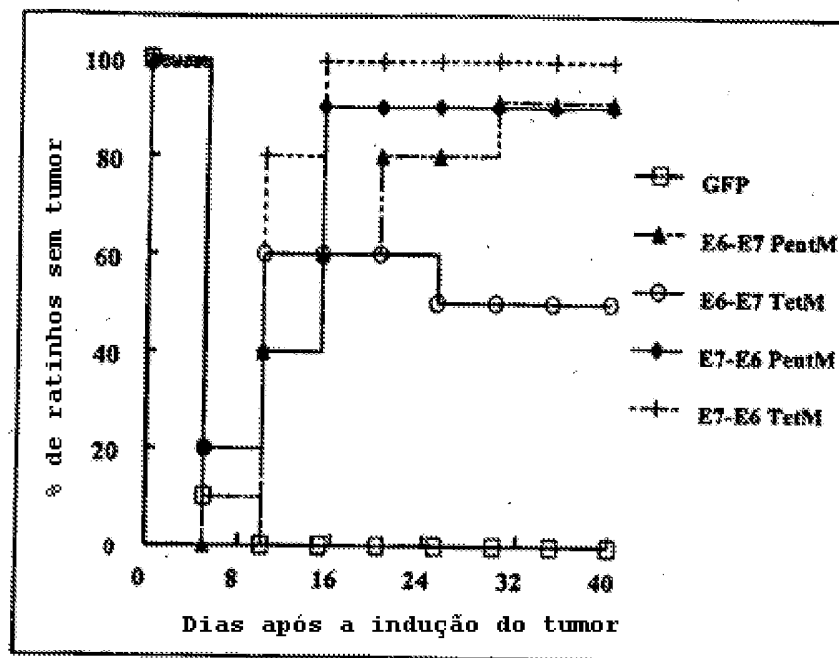


Figura 8

