

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 036**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2016** **PCT/JP2016/052481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016** **WO16121865**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2016** **E 16743468 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021** **EP 3254693**

54 Título: **Composición que contiene una bacteria láctica, composición farmacéutica oral para su uso en el tratamiento de infecciones por VPH y/o tumores asociados a VPH y agente inductor de inmunidad de la mucosa para su uso en dotar de inmunidad mucosal contra la infección por VPH**

30 Prioridad:

30.01.2015 JP 2015017407

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2021

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF TOKYO (50.0%)
3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 113-8654, JP y
JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR
GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
SCIENCES (50.0%)

72 Inventor/es:

KAWANA, KEI y
IGIMI, SHIZUNOBU

74 Agente/Representante:

BUENO FERRÁN , Ana María

ES 2 876 036 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que contiene una bacteria láctica, composición farmacéutica oral para su uso en el tratamiento de infecciones por VPH y/o tumores asociados a VPH y agente inductor de inmunidad de la mucosa para su uso en dotar de inmunidad mucosal contra la infección por VPH

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición que contiene una bacteria láctica en la que una bacteria láctica tiene una proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH) o un mutante de esta en una superficie de la misma, a una composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una enfermedad infecciosa por VPH y tumoral asociada a VPH que incluye la composición que contiene la bacteria láctica, y a un agente inductor de inmunidad de la mucosa que incluye la composición que contiene la bacteria láctica, donde el agente es para su uso para proporcionar inmunidad mucosal contra una infección por VPH.

Técnica anterior

Los virus del papiloma humano (VPH) son virus de ADN. Hasta la fecha, se han registrado 100 o más tipos diferentes de VPH. Los VPH infectan la piel (p. ej., VPH1 y VPH2) y la superficie mucosal (p. ej., VPH6 y VPH11) formando así tumores benignos (verrugas) que duran desde varios meses hasta unos pocos años.

Además, 15 tipos de VPH (p. ej., VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH52 y VPH58) infectan las mucosas durante un largo período de tiempo causando así tumores malignos. Por lo tanto, éstos se conocen como VPH de alto riesgo.

Casi el 100 % de los cánceres de cuello uterino, que tienen la segunda morbilidad más alta después de los cánceres de mama entre los cánceres específicos de la mujer, se desarrollan por la infección de VPH en los órganos reproductores durante un largo período de tiempo. Según se informa, 530.000 personas en el mundo y 15.000 personas en Japón desarrollan cáncer de cuello uterino cada año.

El número de muertes al año por cáncer de cuello uterino llega 270.000 personas en el mundo y a 3.500 en Japón.

En teoría, si las infecciones por el VPH se previenen por completo, el cáncer de cuello uterino se puede erradicar.

Se ha descubierto que la infección por VPH está asociada con el cáncer de vulva, el cáncer de ano, el cáncer de boca, el cáncer de vagina, el cáncer de pene, el cáncer de faringe y el condiloma acuminado (verruga venérea), además del cáncer de cuello uterino. Por lo tanto, se cree que las vacunas profilácticas contra las infecciones por VPH son eficaces para la prevención de los cánceres y enfermedades de transmisión sexual descritas anteriormente. Sin embargo, las vacunas profilácticas existentes contra el VPH solo pueden prevenir dos tipos de VPH de alto riesgo.

Entre los VPH, el VPH16 y el VPH18 representan aproximadamente el 65 % de las causas de cáncer de cuello uterino en mujeres japonesas, especialmente alrededor del 90 % en la veintena.

También se sabe que el VPH16 y el VPH18 son responsables de algo menos del 50 % de las causas de lesiones de alto grado de neoplasia intraepitelial vulvar que preceden al desarrollo del cáncer de vulva y que se asocian con el 85 % del desarrollo de neoplasia intraepitelial vaginal, que puede derivar en cáncer de vagina.

Las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), que son lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino que resultan de la infección por el VPH, ocurren en el epitelio mucoso de la zona vaginal (una mitad o zona inferior que se extiende dentro de la vagina del cuello uterino). Las enfermedades infecciosas por el VPH son enfermedades infecciosas virales en las que los VPH invaden las células basales del epitelio mucoso (epitelio escamoso estratificado) debido a pequeñas lesiones provocadas por las prácticas sexuales y proliferan en el epitelio escamoso. Cuando los VPH proliferan continuamente en el epitelio durante un largo período de tiempo, las células epiteliales se immortalizan y se vuelven cancerosas. Se cree que este es el origen del cáncer de cuello uterino.

En un proceso de desarrollo del cáncer de cuello uterino, se cree que ocurren los siguientes cambios: cuando el VPH se propaga continuamente a las células basales, algunos genes virales del VPH se insertan en genes de las células epiteliales y las proteínas E6 y las proteínas E7, que están subexpresadas, aumentan su expresión continuamente.

Las proteínas E6 y las proteínas E7 se expresan a un nivel muy bajo en CIN1 (displasia leve), que es una característica infecciosa, pero se expresan a alto nivel en CIN2 (displasia moderada) y CIN3 (displasia grave), que se han vuelto cancerosas. Por lo tanto, se cree que es en la fase CIN2 o más tarde cuando las proteínas E6 y las proteínas E7 aumentan continuamente la expresión, como se describe anteriormente.

Se cree que las proteínas E6 y las proteínas E7, especialmente las proteínas E7, de los VPH son dianas atractivas en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra los cánceres asociados a VPH. Esto se debe a que las proteínas E7 son altamente antigénicas en humanos.

Aunque ya se han desarrollado ciertas vacunas terapéuticas que utilizan como antígenos la proteína E7 de los VPH (p. ej., véase NPL 1 y PTL 1), aún no se ha demostrado que eliminen las lesiones precursoras (las CIN) y las células cancerosas en el cuello uterino de los pacientes. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar vacunas que hayan demostrado tener efectos terapéuticos.

Los presentes inventores han descubierto que la respuesta inmune celular específica de E7 se puede elicitar no solo en el bazo, sino también en las mucosas de ratones mediante la administración oral de vacunas (LacE7), que se preparan mediante la expresión de proteínas E7 mutantes (SEQ ID NO. 2) en *Lactobacillus casei*, seguida de un tratamiento térmico para matarlas y secarlas hasta convertirlas en polvo (véase NPL 2). Las proteínas E7 mutantes son aquellas en las que Asp en la posición 21, Cys en la posición 24 y Glu en la posición 26, que participan en la unión con proteínas Rb, se sustituyen por Gly en las proteínas E7 de VPH16.

Los presentes inventores también han estado investigando combinaciones de polipéptidos E7 de VPH y preparaciones Kampo que tienen actividad revitalizante como composiciones farmacéuticas orales terapéuticas para enfermedades infecciosas por VPH (véase PTL 2).

Basándose en la investigación previa de los presentes inventores, se está desarrollando una vacuna terapéutica que ejerza cierto efecto clínico.

Sin embargo, la vacuna terapéutica solo puede causar regresión de CIN3 (displasia grave) a CIN2 (displasia moderada) en las fases que llevan al desarrollo de cáncer de cuello uterino, y es difícil que la vacuna terapéutica alcance un estado normal. Para mejorar aún más el efecto clínico en pacientes que padecen al menos una de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer de cuello uterino en una fase temprana, para normalizar el cáncer, existe una gran necesidad de proporcionar rápidamente una composición farmacéutica oral terapéutica para al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH que mejore la inducción de inmunidad de las mucosas.

PTL 3 se refiere a una preparación oral para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad con infección por un patógeno que comprende bacterias lácticas muertas que expresan, en la superficie, un antígeno del patógeno o una forma microparticulada del mismo, con un tamaño medio de partícula de 2,68-30 μm . El antígeno del patógeno puede ser E7 de VPH.

LISTA DE CITAS

Literatura de patentes

- PTL 1: Solicitud de patente japonesa publicada (JP-A) 2012-514469
- PTL 2: Publicación internacional 2013/191225
- PTL 3: Solicitud de patente japonesa publicada JP2014-210747 A

Literatura no relacionada con patentes

- NPL 1: H. Poo et al., Int J. Cancer, 2006, vol. 119, págs.1702-1709
- NPL 2: K. Adachi et al., Vaccine, 2010, vol. 28, págs. 2810-2817

Sumario de la invención

Problema técnico

La presente invención tiene como objetivo resolver los problemas anteriores y lograr el siguiente objeto. Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que contenga una bacteria láctica con una excelente inducción de inmunidad de las mucosas y una composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH que incluye la composición que contiene una bacteria láctica y un agente inductor de inmunidad de las mucosas que incluya la composición que contiene una bacteria láctica.

Solución al problema

La invención es como se define en las presentes reivindicaciones. Los medios para resolver los problemas anteriores son los siguientes.

1. Una composición que contiene una bacteria láctica que incluye

una bacteria láctica que tiene un polipéptido en su superficie, donde el polipéptido es una proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH) de tipo salvaje o un mutante de la proteína E7, en el que residuos aminoácidos implicados en la unión con una proteína de retinoblastoma (Rb) de la proteína E7 se sustituyen por otros residuos de aminoácidos, donde el polipéptido está fusionado

con una proteína de anclaje que es una proteína de unión a la pared celular cA de AcmA para formar una proteína de fusión, o se expresa a partir de una secuencia de un ácido nucleico que codifica el polipéptido ligado a un gen de anclaje prtP,

en la que el polipéptido se incluye en una cantidad de 0,03 µg a 1,0 µg por 1×10^8 bacterias lácticas en la superficie de la bacteria.

2. Una composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH, incluyendo la composición la composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con 1.
3. Un agente inductor de inmunidad de las mucosas, que incluye la composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con 1, donde el agente es para su uso proporcionando inmunidad de las mucosas contra una infección por VPH.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, éstos pueden resolver los problemas anteriores y lograr el objeto anterior. Es decir, la presente invención puede proporcionar una composición que contiene una bacteria láctica con una excelente inducción de inmunidad de las mucosas y una composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH que incluye la composición que contiene una bacteria láctica y un agente inductor de inmunidad de las mucosas que incluye la composición que contiene una bacteria láctica, donde el agente es para su uso para proporcionar inmunidad de las mucosas contra una infección por VPH.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A: es un diagrama esquemático de pQE31::cA=E7Rb en el ejemplo de producción 1.
 Figura 1B: es el gráfico 1 que ilustra el resultado del análisis FACS en el ejemplo de producción 1.
 Figura 1C: es el gráfico 2 que ilustra el resultado del análisis FACS en el ejemplo de producción 1.
 Figura 1D: es una imagen que ilustra un resultado ejemplar Western blott para varias proteínas.
 Figura 2A: es un diagrama esquemático del anclaje pLGM2::E7Rb=prtP en el ejemplo de producción 2.
 Figura 2B: es un gráfico que ilustra el resultado del análisis FACS en el ejemplo de producción 2.
 Figura 3A: es un gráfico que ilustra el resultado del análisis FACS (condición de medición: 525 de voltaje) en el ejemplo de prueba 1.
 Figura 3B: es un gráfico que ilustra el resultado del análisis FACS (condición de medición: 600 de voltaje) en el ejemplo de ensayo 1.
 Figura 4: es un gráfico que ilustra el resultado del ensayo ELISPOT del ejemplo de ensayo 2.
 Figura 5: es un gráfico que ilustra el resultado del ensayo ELISPOT del ejemplo de ensayo 3.

Descripción de realizaciones

Composición que contiene una bacteria láctica

Una composición que contiene una bacteria láctica de la presente invención incluye al menos una bacteria láctica que tiene un polipéptido, que es una proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH) de tipo salvaje o un mutante de la misma en la superficie de esta y, si es necesario, incluye además otros componentes.

Bacteria láctica

La bacteria láctica no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, pero preferiblemente es una bacteria láctica que pertenece al género *Lactobacillus*, más preferiblemente *Lactobacillus casei*, ya que se ha confirmado que induce una célula T helper tipo 1 (Th1). La bacteria láctica se puede usar sola o en combinación.

La composición que contiene una bacteria láctica puede incluir una bacteria láctica que no tenga la proteína E7 del VPH en su superficie. Sin embargo, la bacteria láctica que tiene una proteína E7 del VPH o un mutante de la misma en su superficie preferiblemente está incluida en un porcentaje del 80 % o más, más preferiblemente del 90 % o más, con particular preferencia del 95 % o más.

Proteína E7 de VPH o mutante de la misma

La proteína E7 de VPH o un mutante de la misma no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, siempre que sean antigénicos. La proteína E7 de VPH puede usarse sola o en combinación.

El tipo de VPH no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, pero preferiblemente es VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH68, VPH73, VPH82, VPH26, VPH53 y VPH63, que pertenecen a un grupo de alto riesgo de

cáncer, más preferiblemente VPH16 y VPH18, con particular preferencia VPH16. Una proteína E7 de VPH16 es un antígeno de cáncer expresado constitutivamente en el cáncer de cuello uterino y cánceres asociados a VPH (p. ej., cáncer de ano, cáncer de faringe, cáncer de pene, cáncer de vulva y cáncer de vagina).

- 5 La proteína E7 del VPH o un mutante de la misma puede ser una proteína E7 de VPH de longitud completa o una proteína E7 de VPH en la que se eliminan, sustituyen o agregan uno a varios aminoácidos.

El polipéptido de VPH es una proteína E7 de tipo salvaje o un mutante de la proteína E7.

- 10 Entre los mutantes de la proteína E7 de VPH es preferible una proteína E7 mutante en la que los residuos aminoácidos implicados en la unión a una proteína Rb de la proteína E7 (es decir, Asp en la posición 21, Cys en la posición 24 y Glu en la posición 26 de la proteína E7 de VPH16 de tipo salvaje (SEQ ID NO. 1)) se han sustituido por otros residuos aminoácidos. Es más preferible una proteína E7 mutante (SEQ ID NO. 2) en la que Asp en la posición 21, Cys en la posición 24 y Glu en la posición 26 de la proteína E7 de VPH16 de tipo salvaje (SEQ ID NO. 1) se han sustituido por Gly.

Cantidad

- 20 La cantidad de la proteína E7 de VPH, o de un mutante de la misma, en la superficie de la bacteria no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo de la finalidad prevista, siempre que sea de 0,03 µg a 1,0 µg por 1×10^8 bacterias lácticas. Sin embargo, la cantidad preferiblemente es de 0,03 µg a 0,3 µg, más preferiblemente de 0,06 µg a 0,3 µg, con particular preferencia de 0,09 µg a 0,3 µg. Es ventajoso que la cantidad se encuentre dentro del intervalo preferente anterior, ya que se puede ejercer un mejor efecto farmacológico (inducción de inmunidad de las mucosas).

- 25 El método para medir la cantidad de proteína E7 de VPH o de un mutante de la misma en una superficie de la bacteria no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen el método de citometría de flujo (FACS), que usa un anticuerpo específico para la proteína E7 de VPH.

- 30 El método FACS puede medir la cantidad de proteína E7 de VPH o de un mutante de la misma en una superficie de la bacteria en una muestra que incluye una cantidad desconocida de proteína E7 de VPH o de un mutante de la misma midiendo de la igual manera una muestra que incluye una cantidad conocida de la proteína E7 de VPH o de un mutante de la misma.

- 35 Aspecto

- La proteína E7 de VPH o un mutante de la misma puede unirse a una superficie de la bacteria láctica (en lo sucesivo, puede denominarse como "del tipo bacteria láctica unida a la proteína E7") o expresarse en una superficie de la bacteria láctica (en lo sucesivo puede denominarse como "bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7"). La bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 y la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 pueden coexistir.

La bacteria láctica puede ser una bacteria viva o una bacteria muerta.

- 45 El método para matar la bacteria no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen un método donde la bacteria se calienta en autoclave a 80 °C durante 5 min.

Bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7

- 50 La bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 puede producirse uniendo la proteína E7 del VPH o un mutante de la misma, que se produce mediante el uso de un método de recombinación genética utilizando una bacteria transformada o un método de síntesis química, a una superficie de la bacteria láctica.

- 55 La proteína E7 del VPH o un mutante de la misma se produce preferiblemente mediante el método de recombinación genética usando una bacteria transformada desde el punto de vista de, por ejemplo, el coste.

- La bacteria utilizada como huésped en el método de recombinación genética no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de ésta incluyen levaduras, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y una bacteria láctica.

- 60 El vector de expresión adecuado para expresar en la proteína E7 de VPH o en un mutante de la misma en la bacteria no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen pQE31.

- 65

El método para transformar la bacteria no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada de entre métodos conocidos en la técnica.

La proteína E7 de VPH o un mutante de la misma producida por la bacteria transformada puede purificarse seleccionando adecuadamente los métodos conocidos en la técnica.

El método para unir la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma a una superficie de la bacteria láctica no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada de entre los métodos conocidos en la técnica, tales como unión covalente y unión eléctrica. Sin embargo, es preferible un método en el que el polipéptido se une eléctricamente a una superficie de la bacteria láctica mediante una proteína de anclaje, de manera que la proteína de anclaje sea una proteína de unión a la pared celular cA de AcMA, que es una peptidoglucano-hidrolasa de *Lactococcus lactis*.

Cuando la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma se une a una superficie de la bacteria láctica a través de la proteína de anclaje, la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma se fusiona con la proteína de anclaje cA para formar una proteína de fusión.

El orden de la proteína de anclaje y la proteína E7 del VPH o un mutante de la misma en la proteína de fusión no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Sin embargo, la proteína de anclaje y la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma se fusionan preferiblemente en este orden. Ejemplos específicos incluyen la secuencia representada por la SEQ ID NO. 3.

El método de unión eléctrica (en lo sucesivo puede denominarse "inmovilización") no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen un método en el que se agrega una solución que incluye la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma y se mezcla con la bacteria láctica.

El tiempo de mezcla no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen aproximadamente 1 hora.

En el método de unión eléctrica, se puede realizar un pretratamiento.

El pretratamiento no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen tratamiento térmico. El tratamiento térmico mata la bacteria láctica.

La condición del tratamiento térmico no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de ésta incluyen calentamiento a 100 °C durante 30 min.

El tratamiento térmico se puede realizar en la bacteria láctica suspendida en ácido tricloroacético (TCA) o en la bacteria láctica suspendida en PBS.

Bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7

La bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 puede producirse cultivando una bacteria láctica que se ha transformado con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma.

El vector de expresión no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen pIGM2. pIGM2 contiene la señal de secreción del gen prtP de *Lactobacillus brevis* ATCC1559 aguas abajo de la secuencia promotora de la proteína de capa-S de *Lactobacillus brevis* ATCC1559 y además contiene el gen de anclaje derivado de *Lactobacillus casei* (secuencia de proteinasa de *L. casei*) aguas abajo de la misma.

Otro ejemplo de vector de expresión incluye un vector que contiene un gen repE mutado, un promotor de aldolasa derivado de una bacteria láctica (Pald) y un gen del complejo ácido poliglutámico-sintasa seleccionado del grupo que consiste en pgsB, pgsC y gSA (véanse los documentos JP- A 2012-514468 y 2012-514469).

El método de transformación no está particularmente limitado y puede seleccionarse de forma adecuada de entre los métodos conocidos en la técnica.

En el caso de la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7, un ácido nucleico que codifica la proteína E7 del VPH o un mutante de la misma se une a un gen de anclaje, que es prtP, que es el gen de anclaje derivado de *Lactobacillus casei* (secuencia de proteinasa de *L. casei*).

El orden del ácido nucleico que codifica la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma y el gen de anclaje no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Sin

embargo, el ácido nucleico que codifica la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma y el gen de anclaje preferiblemente se unen en este orden. Ejemplos de éste incluyen la secuencia representada por la SEQ ID NO. 4.

La bacteria láctica usada para la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, pero preferentemente es *Lactobacillus casei* IGM393 o *Lactobacillus casei* IGM394. *Lactobacillus casei* IGM394 es una cepa subcultivada derivada de *Lactobacillus casei* IGM393 y es una cepa mutante que tiene una alta eficacia de transformación. *Lactobacillus casei* IGM393 y *Lactobacillus casei* IGM394 tienen la homología más alta con una secuencia genómica total de *Lactobacillus casei* BL23.

El método para cultivar la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada de entre los métodos conocidos en la técnica.

El método para modificar la cantidad de expresión de la proteína E7 de VPH o de un mutante de la misma en la superficie de la bacteria en la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen un método donde se ajusta el pH de una solución de cultivo.

Tal como se describe en el ejemplo de producción 2 siguiente, la cantidad de proteína E7 de VPH o de un mutante de la misma en una superficie de la bacteria se puede modificar usando un medio en el que varíe la concentración de bicarbonato de sodio y, por tanto, se ajuste el pH.

El pH de la solución de cultivo no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, aunque preferiblemente es de aproximadamente pH 7.

Cuando la proteína E7 de VPH o un mutante de la misma es una proteína de fusión con la proteína de anclaje, la cantidad de proteína de fusión en una superficie de la bacteria no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, pero preferiblemente es de 0,1 µg a 3,3 g, más preferiblemente de 0,1 µg a 1,0 µg, más preferiblemente de 0,2 µg a 1,0 g, con especial preferencia de 0,3 µg a 1,0 µg por 1×10^8 bacterias lácticas. Es ventajoso que la cantidad se encuentre dentro del intervalo anterior preferente, ya que se puede ejercer un mejor efecto farmacológico (inducción de inmunidad de las mucosas).

Otros componentes

Otros componentes de la composición que contiene una bacteria láctica no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, siempre que no perjudiquen los efectos de la presente invención. Ejemplos de éstos incluyen un portador farmacéuticamente aceptable. Éstos pueden usarse solos o en combinación.

La cantidad de los otros componentes en la composición que contiene una bacteria láctica no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto.

Composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH

Una composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH de la presente invención incluye al menos una composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con la invención, y, si es necesario, además otros componentes.

Composición que contiene una bacteria láctica

La composición que contiene una bacteria láctica es la composición que contiene una bacteria láctica de la presente invención descrita anteriormente.

La cantidad de composición que contiene una bacteria láctica incluida en la composición farmacéutica oral terapéutica para al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto.

Otros componentes

Otros componentes de la composición farmacéutica oral terapéutica para al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éstos incluyen una preparación Kampo con actividad revitalizante (efecto potenciador de la inmunidad), un adyuvante mucosal y un portador farmacéuticamente aceptable. Éstos pueden usarse solos o en combinación.

Preparación Kampo con actividad revitalizante (efecto potenciador de la inmunidad)

La preparación Kampo con actividad revitalizante (efecto potenciador de la inmunidad) no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de ésta incluyen Kakkonto, Juzentaihoto, Hochuekkito, Shosaikoto y Shoseiryuto. Pueden usarse solas o en combinación.

Adyuvante mucosal

El adyuvante mucosal no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos preferentes del mismo incluyen aquellos que potencian adicionalmente la inmunidad humoral y la inmunidad celular específica para una vacuna oral, tal como el polipéptido derivado de la proteína E7 del VPH cooperando con la preparación Kampo con actividad revitalizante (efecto potenciador de la inmunidad).

Ejemplos de adyuvante mucosal incluyen un adyuvante derivado de toxinas bacterianas, una ceramida sintética (α GalCer), un oligonucleótido CpG, (SURFACTEN) SP-C, SP-B, IFN- α (de tipo salvaje o mutante), un ARN bicatenario y un mutante de TNF con actividad mejorada. Éstos pueden usarse solos o en combinación.

El adyuvante derivado de toxinas bacterianas no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen un polipéptido derivado de la toxina del cólera (CT), un polipéptido derivado de la enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*, un polipéptido derivado de la verotoxina (VT), un polipéptido derivado de la toxina de la difteria (DT) y un polipéptido derivado de la toxina de la tosferina (PT).

El adyuvante derivado de toxina bacteriana puede ser un adyuvante derivado de una toxina bacteriana de tipo salvaje o un adyuvante derivado de una toxina bacteriana mutante. Sin embargo, es preferible un adyuvante derivado de una toxina bacteriana mutante donde se haya introducido una mutación de antemano para no causar un efecto secundario grave en caso de la administración oral a humanos.

Portador farmacéuticamente aceptable

El portador farmacéuticamente aceptable no está particularmente limitado y se puede seleccionar de forma adecuada de entre los portadores conocidos en la técnica dependiendo de las formas de dosificación.

La cantidad de los otros componentes en la composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto.

Uso

La composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH puede usarse sola o en combinación con productos farmacéuticos que incluyan otros componentes, tales como componentes activos. La composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH también se puede usar en el estado en que se incorpora en los productos farmacéuticos que incluyen otros componentes, tales como componentes activos.

Forma de dosificación

La forma de dosificación de la composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, siempre que pueda administrarse vía oral. Ejemplos de ésta incluyen una preparación sólida oral (p. ej., un comprimido, un comprimido recubierto, un gránulo, un polvo y una cápsula) y una solución oral (p. ej., un líquido interno, un jarabe y un elixir). La composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH en cualquiera de las formas de dosificación descritas anteriormente se puede producir de acuerdo con métodos convencionales.

Administración

La cantidad de administración, el intervalo de administración y la diana de administración de la composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto.

La cantidad de administración no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada teniendo en cuenta varios factores tales como la edad, el peso, la condición física y síntomas de la diana de administración, y

si se administran productos farmacéuticos o fármacos que incluyen otros componentes tales como componentes activos.

Los ejemplos adecuados de la diana de administración incluyen humanos.

El tumor asociado a VPH no está particularmente limitado y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Ejemplos de éste incluyen cáncer de cuello uterino, cáncer de vulva, cáncer de ano, cáncer de boca, cáncer de vagina, cáncer de pene, cáncer de faringe y sus lesiones precancerosas.

La composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH está convenientemente disponible para su uso en el tratamiento de al menos una neoplasia intraepitelial cervical y un cáncer de cuello uterino en una fase temprana.

El cáncer de cuello uterino en fase temprana incluye el carcinoma microinvasivo.

La composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH es adecuada para su uso como vacuna terapéutica para tratar una enfermedad infecciosa por VPH mediante su administración a un paciente que padece una enfermedad infecciosa por VPH.

Uso en un método para tratar al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH

La composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH puede tratar al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH en un individuo vía su administración oral al individuo. Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de un método para tratar al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH, incluyendo el método la administración oral de la composición farmacéutica oral terapéutica a un individuo para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH.

Agente inductor de inmunidad de las mucosas

El agente inductor de inmunidad de las mucosas de la presente invención incluye al menos una composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con la presente invención y, si es necesario, además otros componentes.

Composición que contiene una bacteria láctica

La composición que contiene una bacteria láctica es la composición que contiene una bacteria láctica de la presente invención anteriormente descrita.

La cantidad de la composición que contiene una bacteria láctica incluida en el agente inductor de inmunidad de las mucosas no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto.

Otros componentes

Otros componentes del agente inductor de inmunidad de las mucosas no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto. Por ejemplo, pueden ser los mismos que los descritos en la sección titulada "Otros componentes" para la composición farmacéutica oral terapéutica para usar en el tratamiento de al menos una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH.

La cantidad de los otros componentes incluidos en el agente inductor de inmunidad de las mucosas no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto.

Uso

El agente inductor de inmunidad de las mucosas se puede usar solo o en combinación con productos farmacéuticos que incluyen otros componentes como componentes activos. El agente inductor de inmunidad de las mucosas también se puede usar en el estado en el que se incorpora en los productos farmacéuticos que incluyen otros componentes tales como componentes activos.

Forma de dosificación

La forma de dosificación del agente inductor de inmunidad de las mucosas no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto, siempre que pueda administrarse vía oral. Ejemplos de ésta incluyen una preparación sólida oral (p. ej., un comprimido, un comprimido recubierto, un gránulo,

un polvo y una cápsula) y una solución oral (p. ej., un líquido interno, un jarabe y un elixir). El agente inductor de inmunidad de las mucosas en cualquiera de las formas de dosificación descritas anteriormente se puede producir de acuerdo con métodos convencionales.

5 Administración

La cantidad de administración, el intervalo de administración y la diana de administración del agente inductor de inmunidad de las mucosas no están particularmente limitados y pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito previsto.

La cantidad de administración no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada teniendo en cuenta varios factores, tales como la edad, el peso, la condición física y síntomas de la diana de administración, y si se administran productos farmacéuticos o fármacos que incluyen otros componentes, tales como componentes activos.

Ejemplos adecuados de la diana de administración incluyen humanos.

El agente inductor de inmunidad de las mucosas puede inducir una respuesta inmune celular específica de la proteína E7 del VPH en las mucosas.

Método para inducir inmunidad de las mucosas

El agente inductor de inmunidad de las mucosas puede inducir inmunidad de las mucosas de un individuo administrándose vía oral al individuo. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para inducir inmunidad de las mucosas, incluyendo el método la administración oral del agente inductor de inmunidad de las mucosas a un individuo.

Ejemplos

Los ejemplos de producción y los ejemplos de ensayo de la presente invención se describen a continuación, aunque la presente invención no se limita a los mismos de ninguna manera.

Ejemplo de producción comparativo 1: producción de una preparación de LacE7 conocida

Se produjo una preparación de LacE7, que era una preparación conocida, de acuerdo con el método descrito en Poo H. et al., Int. J. Immunol., 2006, vol. 119, págs. 1.702-1.709.

En resumen, una proteína E7 mutante derivada del VPH16 que consistía en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 2, es decir, en la que Asp en la posición 21, Cys en la posición 24 y Glu en la posición 26, involucradas en la unión a una proteína Rb, de una proteína E7 de tipo salvaje se habían sustituido por Gly, se introdujo mediante un vector de expresión en *Lactobacillus casei*, que se había confirmado que inducía una célula T helper de tipo 1 (célula Th1). El recombinante resultante (LacE7) se cultivó en un medio y luego se mató mediante calentamiento. El LacE7 se purificó del medio, se lavó con agua destilada varias veces y luego se secó hasta obtener un polvo (preparación de LacE7). La preparación resultante se almacenó a 4 °C hasta su uso. La preparación de LacE7 era insoluble en un disolvente acuoso.

Ejemplo de producción 1: producción de una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante

Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante se produjo de la siguiente manera. La proteína E7 mutante (SEQ ID NO. 2) era un polipéptido derivado de la proteína E7 de VPH.

Producción de la proteína E7 mutante

Construcción del plásmido para expresar la proteína en la que se insertó la secuencia de fusión de cA y la proteína E7 mutante

La proteína cA es una proteína de anclaje y se utilizó como herramienta para inmovilizar la proteína E7 mutante en una superficie de una bacteria láctica. La cA puede inmovilizar proteínas en el peptidoglicano de una bacteria grampositiva a través de una carga eléctrica y un determinado motivo y es una proteína de unión a la pared celular derivada de AcmA, que es una peptidoglicano-hidrolasa de *Lactococcus lactis* (Tjibbe Bosma, Rolf Kanninga, Jolanda Neely Sandrine A. L. Audouy, Maarten L. van Roosmalen, Anton Steen, Girbe Buist, Jan Kok, Oscar P. Kuipers, George Robillard y Kees Leenhouts (2006) Novel Surface Display System for Proteins on Non-Genetically Modified Gram-Positive Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. Págs. 880-889).

La secuencia de fusión de la cA y la proteína E7 mutante (véase SEQ ID NO. 3) se insertó en un vector plásmido pQE31 usando un método convencional (en lo sucesivo puede denominarse "pQE31::cA=E7Rb", véase la figura 1A).

Transformación

Como huésped para expresar la proteína de fusión de cA y la proteína E7 mutante se utilizó CLEARCOLI® (cepa modificada de *E. coli* BL21DE3 LPS, Lucigen).

En primer lugar, CLEARCOLI® se transformó empleando un método de electroporación para así introducir pREP4 (invitrogen) en el mismo.

A continuación, se introdujo pQE31::cA=E7Rb en el transformante resultante empleando un método de cloruro de calcio para así obtener una *E. coli* que expresaba la proteína de fusión la cA y la proteína E7 mutante (en lo sucesivo puede denominarse "CLEARCOLI®pQE31::cA=E7Rb, pREP4").

Expresión y purificación de proteína de fusión

Se inoculó un asa de platino de *E. coli* en un medio líquido Luria-Bertani (LB) (laboratorios Difco) que contenía ampicilina (concentración final: 100 µg/ml) y kanamicina (concentración final: 25 µg/ml) y se cultivó con agitación a 37 °C durante la noche.

La *E. coli* así cultivada se recogió y se lavó. Luego, se le agregó la misma cantidad de PBS que se usó para el cultivo. El resultado en una cantidad igual a 1/20 de la de un medio líquido LB para el cultivo principal se inoculó en el medio líquido LB para el cultivo principal que contenía ampicilina (concentración final: 100 µg/ml) y kanamicina (concentración final: 25 µg/ml).

El cultivo principal se realizó mediante cultivo con agitación a 37 °C. Cuando se alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0,5, se agregó IPTG para proporcionar una concentración final 1 mM. Luego, el resultado se cultivó con agitación a 37 °C durante 4 horas para inducir así la expresión de la proteína de fusión.

La *E. coli* se recogió de la solución de cultivo así inducida. Se agregaron cinco mililitros por g de *E. coli* de tampón de lisis (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 8) a la misma y después se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 1 hora. El resultante se centrifugó a 10.000xg durante 30 min a 4 °C y luego se recogió el sobrenadante.

Se mezclaron suavemente cuatro mililitros del sobrenadante así recogido, a temperatura ambiente, durante 40 min, con 1 ml de resina de afinidad metálica (Clontech) TALON® que se había equilibrado con tampón de lisis. La solución mixta resultante del sobrenadante y la resina se transfirió a columnas de polipropileno (QIAGEN) para eliminar el sobrenadante. El resultante se lavó dos veces con 4 ml de tampón de lavado (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 6,3) y se eluyó una proteína de fusión etiquetada con His con tampón de elución 1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 150 mM imidazol, pH 5,9) y tampón de elución 2 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 300 mM imidazol, pH 4,5).

La solución de proteína así recogida se desalinizó mediante diálisis y se concentró por ultrafiltración usando ULTRACEL®-10k (Merck Millipore).

La concentración de proteína en la solución proteica así concentrada se midió mediante el ensayo de proteína Bradford QUICK START® (BIO-RAD) y luego la solución se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Confirmación de la proteína de fusión mediante Western Blott

En el cultivo principal descrito en la sección "Expresión y purificación de la proteína de fusión", la solución de cultivo resultante a la que se había agregado IPTG y se había cultivado a 37 °C durante 4 horas se centrifugó a 10.000xg durante 3 min y luego se recogió la *E. coli* de la misma. Se descartó el sobrenadante. El sedimento resultante se suspendió en 100 µl de tampón de muestra 1x SDS-PAGE. El líquido de suspensión así suspendido se calentó a 100 °C durante 5 min.

El líquido de suspensión así calentado se sometió a electroforesis por SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF (EDM Millipore).

La membrana así transferida se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en una solución de anticuerpo primario (BSA al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS (-), IgG anti-His de ratón (mAb anti-His-tag, LABORATORIOS MÉDICOS Y BIOLÓGICOS CO., LTD.) (1:2.000)).

Posteriormente, la membrana se lavó dos veces con PBST.

Luego, la membrana se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en una solución de anticuerpo secundario (BSA al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS (-), IgG de cabra anti-ratón HRP (IgG anti-ratón (molécula completa) -Anticuerpo de peroxidasa producido en cabra, SIGMA-ALDRICH) (1:10.000)).

Posteriormente, la membrana se lavó dos veces con PBST.

Luego, se confirmó la expresión de la proteína de fusión prevista mediante la detección de bandas por ECL Plus (GE Health care Life Science) con Chemi doc (laboratorios Bio-Rad).

Unión a la superficie de la bacteria láctica

La proteína de fusión de cA y proteína E7 mutante se unió a una superficie de una bacteria láctica (en lo sucesivo se puede denominar "inmovilización") de la siguiente manera, con referencia a Tjibbe Bosma, Rolf Kanninga, Jolanda Neef Sandrine A. L. Audouy, Maarten L. van Roosmalen, Anton Steen, Girbe Buist, Jan Kok, Oscar P. Kuipers, George Robillard y Kees Leenhouts (2006) Novel Surface Display System for Proteins on Non-Genetically Modified Gram-Positive Bacteria. Appl. Environ. Reinar. Microbiol. pág. 880-889.

Cultivo de la bacteria láctica

Como bacteria láctica se usó *Lactobacillus casei* IGM393, que previamente se había confirmado que tenía un efecto adyuvante como portador de antígeno (Kajikawa A, Igimi S (2010) Innate and acquired immune responses induced by recombinant Lactobacillus casei displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. Vaccine 28: 3409-3415).

La bacteria láctica se cultivó estáticamente a 37 °C durante la noche en un medio líquido Mann-Rogosa-Sharp (MRS) (laboratorios Difco). La bacteria láctica se recogió de la solución de cultivo resultante y se lavó dos veces con PBS.

Pretratamiento para la inmovilización

Para el pretratamiento para la inmovilización, se prepararon dos tipos de bacterias lácticas, esto es "la bacteria láctica tratada con ácido tricloroacético (TCA) (en lo sucesivo puede denominarse como "con tratamiento con TCA") y "la bacteria láctica tratada con PBS (en lo sucesivo puede denominarse "sin tratamiento con TCA").

La bacteria láctica se trató con TCA resuspendiendo la bacteria en TCA al 10 % en una cantidad 0,2 veces mayor que la de la solución de cultivo, calentando a 100 °C durante 30 min y lavando con PBS tres veces.

La bacteria láctica se trató con PBS resuspendiendo la bacteria en PBS en una cantidad 0,2 veces mayor que la de la solución de cultivo, calentando a 100 °C durante 30 min y lavando con PBS tres veces.

Inmovilización

La proteína de fusión se agregó en una cantidad de 1,0 µg, 0,3 µg, 0,1 µg o 0,03 µg (correspondiente a 0,3 µg, 0,09 µg, 0,03 µg o 0,009 µg en relación con la proteína E7 mutante, respectivamente) por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas pretratadas. El resultante se mezcló en una solución de PBS que contenía la proteína de fusión durante 1 hora. Como resultado, la proteína de fusión se unió eléctricamente a una superficie de la bacteria láctica.

Después de la mezcla, el resultante se lavó con PBS tres veces y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

De ese modo, se obtuvieron las bacterias lácticas de tipo unidas a la proteína E7 mutantes que se describen a continuación:

- 1) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,3 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA);
- 2) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,09 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA);
- 3) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,03 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA);
- 4) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,009 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA);
- 5) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,3 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA);
- 6) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,09 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA);
- 7) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,03 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA);
- 8) Una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,009 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA);

Análisis FACS

Las bacterias lácticas de tipo unidas a la proteína E7 mutante (1) a (8) se marcaron de forma fluorescente con un anticuerpo específico para la proteína E7 de VPH y luego se confirmó su inmovilización mediante citometría de flujo (FACS, BD).

En concreto, cada una de las bacterias lácticas de tipo unidas a la proteína E7 mutante se mezcló de forma invertida (temperatura ambiente, 60 min) en 0,5 ml de una solución de anticuerpo primario (BSA al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS (-), IgG de ratón anti-VP16 E7 (anticuerpo de proteína E7 de VPH tipo 16 [289-17013 (TVG-701Y)], GeneTbx) (1:1.000)). Posteriormente, el resultante se centrifugó (15.000xg, 3 min) y luego se lavó dos veces con PBS (-). A continuación, el resultante se mezcló de manera invertida con sombreado (temperatura ambiente, 60 min) en 0,5 ml de una solución de anticuerpo secundario (BSA al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS (-), IgG anti-ratón Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor® 488 IgG de cabra anti-ratón (H + L), Life Technologies) (1:500)). Posteriormente, el resultante se centrifugó (15.000xg, 3 min) y luego se lavó dos veces con PBS (-).

Posteriormente, al resultante se agregó con PBS (-) hasta un volumen de 0,6 ml y se sometió a FACS para detectar así la fluorescencia.

Debe señalarse que aquellos que se prepararon de la misma manera, excepto sin utilizar la proteína de fusión, se utilizaron como control negativo.

Los resultados se ilustran en las figuras 1B y 1C.

En la figura 1B, "N" representa el resultado del control negativo, "(1)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,3 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA), "(2)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,09 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA), "(3)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,03 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA) y "(4)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,009 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA).

En la figura 1C, "N" representa el resultado del control negativo, "(5)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,3 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA), "(6)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,09 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA), "(7)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,03 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA), y "(8)" representa el resultado de la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,009 µg de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA).

Para los resultados de las figuras 1B y 1C, se indicó que la intensidad de la fluorescencia se mejoraba con un aumento de la cantidad de proteína E7 mutante.

Hay que observar que, cuando la cantidad de la proteína E7 mutante era de 0,9 µg por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas, se obtuvo un resultado similar para el del caso en que la proteína E7 mutante era de 0,3 µg por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas. Por lo tanto, se encontró que la cantidad de proteína E7 mutante que se unía a la superficie de la bacteria se saturaba a aproximadamente 0,3 µg.

Es de señalar que en la figura 1D se ilustra un resultado de Western Blott ilustrativo de las proteínas que se describen a continuación.

Proteína

- Proteína de fusión etiquetada con His de proteína cA y E7 mutante (48 kDa);
- cA etiquetada con His (33 kDa); y
- Proteína E7 mutante etiquetada con His (15 kDa).

En la figura 1D, "1" representa el resultado de la "proteína de fusión de cA etiquetada con His y de la proteína E7 mutante", "2" representa el resultado de la "cA etiquetada con His", "3" y "5" representan el resultado de una "muestra preparada a partir de *E. coli* antes de la inducción de expresión de la cA etiquetada con His", "4" y "6" representan el resultado de una "muestra preparada a partir de *E. coli* después de la inducción de expresión de la cA etiquetada con His", "7" representa el resultado de la "proteína E7 mutante etiquetada con His", "8" y "10" representan el resultado de una "muestra preparada a partir de *E. coli* antes de la inducción de la expresión de la proteína E7 mutante etiquetada con His", "9" y "11" representan el resultado de una "muestra preparada a partir de *E. coli* después de la inducción de expresión de la proteína E7 mutante etiquetada con His".

Ejemplo de producción 2: producción de la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante

Se obtuvo una bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante en cuya superficie se expresaba la proteína E7 mutante (SEQ ID NO. 2), que era un polipéptido derivado de la proteína E7 de VPH, de la siguiente manera.

Utilizando, como vector plásmido pIGM2 (Kajikawa Akinobu, Eiko Ichikawa y Shizunobu Igimi (2010) Development of a Highly Efficient Protein-Secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*, J. Microbiol. Biotechnol., 2F0 (2), 375-382), se produjo un vector plásmido en el que se insertó una secuencia que codifica la proteína E7 mutante (SEQ ID NO. 2) y un gen de anclaje derivado de *Lactobacillus casei* (secuencia proteínica de *L. casei*) unidos en ese orden (SEQ ID No. 4) (en lo sucesivo puede denominarse "anclaje pIGM2::E7Rb=prtP") (véase la figura 2A).

Se eliminó una secuencia de terminación del vector plásmido. El resultante se introdujo en *Lactobacillus casei* IGM394 empleando un método de electroporación (en lo sucesivo puede denominarse "*L. casei* IGM394 [pEK7::E7Rb]").

Como control negativo, se obtuvo la cepa IGM394 de *Lactobacillus casei* en la que se introdujo un vector plásmido de la misma manera descrita anteriormente, excepto que no se insertó la secuencia que codifica la proteína E7 mutante (SEQ ID NO. 2) y un gen de anclaje derivado de *Lactobacillus casei* (secuencia proteínica de *L. casei*) unidos en este orden (SEQ ID NO. 4) en el vector plásmido (en lo sucesivo puede denominarse "*L. casei* IGM394 [pLP vacío]").

La bacteria láctica se sembró en un medio líquido (MRSE), que era Mann-Rogosa-Sharp (laboratorios Difco), suplementado con 5 µg/ml de Em y luego se cultivó a 37 °C durante la noche (aproximadamente 14 horas). La bacteria láctica se recogió de la solución así cultivada (5.000g x 10 min) y se lavó una vez con PBS (5.000g x 10 min). Se le agregó PBS para ajustar así la concentración del líquido de suspensión celular resultante a 1×10^9 UFC/ml.

El líquido de suspensión celular así ajustado se sembró con 1 l de MRSE ((i) sin adición de NaHCO_3 , pH 6,4, (ii) con adición de 10 mM NaHCO_3 , pH 6,8, o (iii) con adición de 25 mM NaHCO_3 , pH 7,1) en una cantidad igual al 10 % de MRSE (1×10^8 UFC/ml). El resultante se cultivó a 37 °C durante aproximadamente 5 horas con agitación suave en condiciones anaeróbicas (usando ANAEROPACK).

Cabe señalar que la bacteria láctica que sirve como control negativo se cultivó en (i) MRSE sin adición de NaHCO_3 .

La bacteria láctica se recogió de la solución así cultivada (5.000g x 10 min) y se lavó una vez con PBS (5.000g x 10 min). Se agregaron treinta mililitros de PBS para ajustar así la concentración final del líquido de suspensión celular resultante a $7,5 \times 10^9$ células/ml ($\text{OD} \approx 7,5$). Hay que tener en cuenta que el número de bacterias lácticas se contó con un hemocitómetro.

El líquido de suspensión celular se esterilizó en autoclave a 80 °C durante 5 min para matar las bacterias. Además, las bacterias que no se habían esterilizado en autoclave se utilizaron como muestra bacteriana viva.

Así, se obtuvieron las bacterias lácticas de tipo expresadas en la proteína E7 mutante que se describen a continuación:

- (i-1) Una bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que se había cultivado en MRSE sin adición de NaHCO_3 (pH 6,4) y muerta;
- (i-2) Una bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que se había cultivado en MRSE sin adición de NaHCO_3 (pH 6,4) y viva;
- (ii-1) Una bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que se había cultivado en MRSE con la adición de 10 mM NaHCO_3 (pH 6,8) y muerta;
- (ii-2) Una bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que se había cultivado en MRSE con la adición de 10 mM NaHCO_3 (pH 6,8) y viva;
- (iii-1) Una bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que se había cultivado en MRSE con la adición de 25 mM NaHCO_3 (pH 7,1) y muerta; y
- (iii-2) Una bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que se había cultivado en MRSE con la adición de 25 mM NaHCO_3 (pH 7,1) y viva.

Análisis FACS

Las bacterias lácticas de tipo expresadas en la proteína E7 mutante (i-1), (ii-1) y (iii-1) y el control negativo se sometieron a análisis FACS de la misma manera que en el ejemplo de producción 1 para confirmar con ello el grado de expresión de la proteína E7 mutante en las superficies de las bacterias por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas. Los resultados se ilustran en la figura 2B.

En la figura 2B, "N" representa el resultado del control negativo (bacteria láctica de tipo expresada en la proteína muerta que había sido cultivada en MRSE con la adición de 25 mM de NaHCO_3 (pH 7,1) y muerta).

Para el resultado de la figura 2B, se indicó que la cantidad de expresión de la proteína E7 mutante en la superficie de la bacteria podía modificarse ajustando el pH de la solución de cultivo.

Ejemplo de ensayo 1: comparación de la cantidad de proteínas E7 mutantes en la superficie de las bacterias

Las muestras que se describen a continuación se sometieron a análisis FACS de la misma manera que en el ejemplo de producción 1 para comparar así la cantidad de proteínas E7 mutantes en la superficie de las bacterias por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas. Los resultados se ilustran en las figuras 3A y 3B.

5 Muestras

- I. El control negativo del ejemplo de producción 2 (bacterias muertas);
- II. La preparación de LacE7 producida en el ejemplo de producción comparativo 1;
- 10 III. La bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron $0,03 \mu\text{g}$ de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA) de (3) en el ejemplo de producción 1; y
- 15 IV. La bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que había sido cultivada en MRSE con la adición de 25 mM NaHCO_3 (pH 7,1) y muerta de (III-1) en el ejemplo de producción 2.

En las figuras 3A y 3B, "(I)" representa el resultado de la muestra (I), "(II)" representa el resultado de la muestra (II), "(III)" representa el resultado de la muestra (III) y "(IV)" representa el resultado de la muestra (IV).

Para el resultado de la figura 3A (condición de medición: 525 de voltaje), se indicó que, en la preparación de LacE7 existente, la intensidad de fluorescencia estaba ampliamente distribuida, es decir, había un mayor número de bacterias lácticas en cuyas superficies que no se expresaban las proteínas E7 mutantes. Además, para el resultado de la figura 20 3B (condición de medición: 600 de voltaje), se indicó que, en la preparación de LacE7 existente, la proteína E7 mutante en la superficie de la bacteria se expresaba menos.

Mientras tanto, en la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que había sido cultivada en MRSE con la adición de 25 mM NaHCO_3 (pH 7,1) y muerta de (III-1) del ejemplo de producción 2, la cantidad de expresión 25 de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas se estimó que era de aproximadamente $0,3 \mu\text{g}$.

Ejemplo de ensayo 2: prueba-1 de inducción de inmunidad de las mucosas contra VPH

Se realizó un ensayo de inducción de inmunidad de las mucosas frente a VPH de la siguiente manera, usando la 30 preparación de LacE7 producida en el ejemplo comparativo 1.

Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones vía oral con la preparación de LacE7 de acuerdo con el procedimiento descrito en K. Adachi 35 et al., Vaccine, 2010, vol. 28, págs. 2810-2817.

Administración oral de la preparación de LacE7 a ratones

Se inmunizaron ratones hembra SPF C67BL de seis semanas de edad (CLEA Japan, Inc.) con la preparación de 40 LacE7 mediante administración oral.

La preparación de LacE7 ($0,1 \text{ mg}$, $0,3 \text{ mg}$ o $1,0 \text{ mg}$ por ratón) se administró durante un total de 4 rondas en las 45 semanas 1, 2, 4 y 6. Para toda la administración, la preparación de LacE7 se suspendió en $200 \mu\text{l}$ de PBS y se administró vía una sonda intragástrica después de 3 horas de ayuno una vez al día durante cinco días consecutivos a la semana.

Recogida de intestinos

Una semana después de la última inoculación de la preparación de LacE7 (en la semana 7), se diseccionaron los 50 cinco ratones a los que se había inoculado la preparación de LacE7, recogiendo los intestinos. Después de eliminar las heces de los intestinos, se lavó el interior de cada uno de los tractos intestinales con 10 ml de HBSS suplementado con un inhibidor de proteasa.

Preparación de linfocitos de mucosa murinos

55 Cada intestino se abrió longitudinalmente y se agitó vigorosamente en un medio PRMI1640, que contenía 10% en peso de suero bovino fetal inactivado, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato sódico, $1 \times$ aminoácidos no esenciales y 50 mM 2-mercaptoetanol, suplementado con FBS al 10% en peso, 100 unidades/ml de penicilina y $100 \mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, a 37°C , durante 30 min . Se recogió el líquido de suspensión celular, se pasó a través de un colador 60 de células BD FALCON® (BD Bioscience, EE.UU.) para eliminar así restos de tejido y luego se sometieron a centrifugación en gradiente de densidad discontinua en un tubo de 15 ml , en el que se estratificó un 40% en peso de PERCOLL PLUS en un 70% en peso de PERCOLL PLUS. Aproximadamente entre 10^7 a aproximadamente 10^8 de células se colocaron por capas encima, seguido de centrifugación a $600 \times g$ y temperatura ambiente durante 20 min . Como resultado, los linfocitos de las mucosas (viabilidad celular: 95%) se concentraron en la interfaz entre el 70% 65 en peso de la capa PERCOLL PLUS y el 40% en peso de la capa PERCOLL PLUS. Se obtuvieron entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 10×10^6 linfocitos de mucosa de cada ratón.

Ensayo ELISPOT

Se incubaron cincuenta microlitros de una suspensión de linfocitos de la mucosa intestinal (5×10^6 células/ml) durante 24 horas a 37 °C junto con células presentadoras de antígenos.

De acuerdo con las instrucciones del fabricante del KIT MOUSE IFN- γ ELISPOT (MABTECH AB, Suecia), se agregaron gota a gota 10 μ l de un péptido sintético (1 μ g/ml) que consistía en aquellos aminoácidos de las posiciones 49 a 57 de la proteína E7 de los que se había indicado eran un epítipo CTL para la proteína E7 de VPH16 (SEQ ID NO. 1), mitógeno (40 ng/ml de acetato-miristato de forbol más 4 μ g/ml de ionomicina) o medio solo (control) a una placa de 96 pocillos (por ejemplo, placa ELIIP, Millipore, EE.UU.) recubierta con anticuerpos IFN- γ anti-ratón. El número de puntos positivos para IFN- γ en la placa de 96 pocillos se analizó con un sistema de análisis de imágenes de vídeo asistido por ordenador totalmente automatizado, KS ELISPOT (Carl Zeiss Vision, Alemania).

Análisis estadístico

Los datos de ELISPOT se representaron como media $\pm$ desviación estándar. Estos valores o valores relativos se compararon entre los grupos de inmunización (5 ratones/grupo) usando una prueba t de Student bilateral. Se consideró significativo un valor $p < 0,05$.

Los resultados del ejemplo de ensayo 2 se ilustran en la figura 4.

Como queda claro en la figura 4, el número de células productoras de IFN- γ por 10^6 células aumentó en función de la cantidad administrada.

Además, para los resultados de la figura 4, el número de células productoras de IFN por 10^6 se calculó en 65,8 células en el caso de administrarse 0,5 mg de la preparación de LacE7 (como se indica con la flecha en la figura 4).

Ejemplo de ensayo 3: prueba 2 de inducción de inmunidad de las mucosas frente a VPH

La prueba de inducción de inmunidad de las mucosas frente a VPH se realizó de la misma manera que en el ejemplo de ensayo 2, excepto que cada una de las muestras que se describen a continuación se administró a 0,5 μ m/ratón.

Muestras

- Muestra-1: la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,3 μ g de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (con tratamiento con TCA) de (1) en el ejemplo de producción 1;
- Muestra-2: la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,09 μ g de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA) de (6) en el ejemplo de producción 1;
- Muestra-3: la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante a cuya superficie se unieron 0,3 μ g de la proteína E7 mutante por $1,0 \times 10^8$ bacterias lácticas (sin tratamiento con TCA) de (5) en el ejemplo de producción 1;
- Muestra-4: la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que había sido cultivada en MRSE con la adición de 25 mM NaHCO₃ (pH 7,1) y viva de (iii-2) en el ejemplo de producción 2; y
- Muestra-5: la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante que había sido cultivada en MRSE con la adición de 25 mM NaHCO₃ (pH 7,1) y muerta de (iii-1) en el ejemplo de producción 2.

Los resultados se ilustran en la figura 5. En la figura 5, los números del 1 al 5 en el eje horizontal representan los números de muestra.

En la figura 5 también se ilustran los resultados del ejemplo de ensayo 2. En la figura 5, A representa el resultado en el caso en el que la preparación de LacE7 se administró a 0,1 mg/ratón en el ejemplo de ensayo 2, B representa el resultado en el caso en el que la preparación de LacE7 se administró a 0,3 mg/ratón en el ejemplo de ensayo 2 y C representa el resultado en el caso en el que la preparación de LacE7 se administró a 1,0 mg/ratón en el ejemplo de ensayo 2.

La flecha de la figura 5 representa el número de células productoras de IFN- γ por cada 10^6 células en el caso de la administración de la preparación de LacE7 a 0,5 mg/ratón calculado a partir de los resultados del ejemplo de ensayo 2.

Para los resultados de la figura 5, se indicó que las muestras 1 a 5, que eran la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante o la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante de la presente invención, tenían una inducción de inmunidad frente a VPH mucho mejor que la preparación de LacE7, que era la preparación conocida, administrada en la misma cantidad que las muestras.

En particular, se indicó que la inducción de inmunidad frente a VPH de las muestras 2 a 5 era mucho mejor, es decir, aproximadamente el doble que la de la preparación de LacE7, que era la preparación conocida, administrada en la misma cantidad que las muestras.

En el ensayo clínico de pacientes humanos con CIN3 que usan la preparación de LacE7 conocida realizada por los presentes inventores, el número de células productoras de IFN- γ en el grupo curado se comparó con el del grupo no curado. Se demostró que el número de células productoras de IFN- γ en el grupo curado era aproximadamente el doble que en el grupo no curado (K. Kawana et al., "Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients", Vaccine, 29 de octubre de 2014; 32 (47): 6233-9).

Por lo tanto, con base en el hecho de que el número de células productoras de IFN- γ en aquellos a los que se les administró la bacteria láctica de tipo unida a la proteína E7 mutante o la bacteria láctica de tipo expresada en la proteína E7 mutante de la presente invención era aproximadamente el doble que en aquellos a los que se les administró la preparación de LacE7 conocida en la misma cantidad, se espera que la bacteria láctica de la presente invención mejore significativamente el efecto clínico (porcentaje de respuesta).

Listado de secuencias

<110> Fundación de Ciencias de la Salud de la Universidad de Tokio, Japón

<120> Composición que contiene bacterias lácticas, composición farmacéutica oral para el tratamiento de al menos una de una infección por el VPH y un tumor asociado al VPH e inductor de inmunidad de las mucosas

<130> N-ST016-15P

<150> JP 2015-017407

<151> 2015-01-30

<160> 4

<170> Versión PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 98

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

<400> 1

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> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

<400> 2

```

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

Pro Glu Thr Thr Gly 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

```

5 <210> 3
 <211> 975
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 3

```

tcttctgctg gtacttctaa ttccggtggt tcaacagcta caaataccaa taataattca    60
aatacaagct caaccactta tacagttaaa tctggcgata cactttgggg aatttcgcaa    120
aaatatggaa ttagtggtgc tcaaattcaa agcgcaaaca atcttaaaag tacagtcata    180
tatattgggc aaaagcttgt attgacaact tcaagttctt cgtctaatac aaatagttca    240
acttcttcag gaaattctgc cggaactaca acgcctacta cttcggtcac tctgccaaa    300
ccagcttcac agacgacgat taaggttaaa tctggtgata cgctttgggg actctctgtc    360
aaatataaaa cgacgattgc tcaactcaag agttggaatc atttgaattc tgatacaatt    420
ttcattggac aaaacttgat tgtttcacia tctgccggtt cttcaagttc ttcaacaggt    480
tcaagctcag cctctacgag ttcaacttct aactottctg cagcttcaaa tacctctatc    540
cataaggttg ttaaaggaga tacgctttgg ggactttcac aaaaatctgg tagcccaatt    600
gcttcaatta aggcttgga tcatattatca agtgatacca ttttaattgg tcaatatctt    660
cgtattaaag aggatccgat gcatggagat acacctacat tgcataaata tatgttagat    720
ttgcaaccag agacaactgg tctctacggt tatgggcaat taaatgacag ctgagaggag    780
gaggatgaaa tagatggtcc agctggacaa gcagaaccgg acagagccca ttacaatatt    840
gtaacctttt gttgcaagtg tgactctacg cttcgggtgt gcgtacaaag cacacacgta    900

gacattcgta ctttgaaga cctgttaatg ggcacactag gaattgtgtg ccccatctgt    960
tctcagaaac cataa                                         975

```

15 <210> 4
 <211> 624

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

5

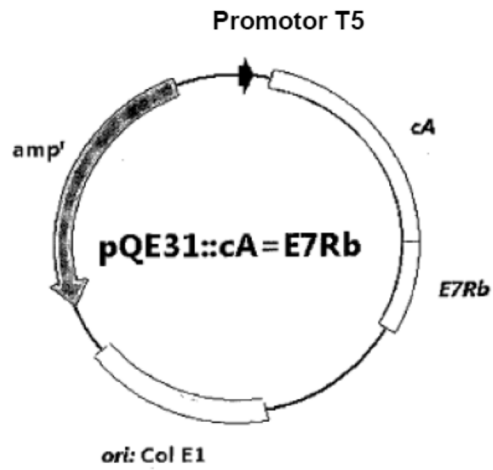
<400> 4

atgcatggag atacacctac attgcatgaa atatgttaga ttgcaacca gagacaactg	60
gtctctacgg ttatgggcaa ttaaatgaca gctcagagga ggaggatgaa atagatggtc	120
cagctggaca agcagaaccg gacagagccc attacaatat tgtaaccttt tgttgcaagt	180
gtgactctac gcttcggttg tgcgtacaaa gcacacacgt agacattcgt actttggaag	240
acctgttaat gggcacacta ggaattgtgt gcccacatctg ttctcagaaa ccactcgagg	300
cagctgccgt tgaagcggcc aagacagctg gtaaaggcga cgatacaagc ggtactagcg	360
acaaaggcgg cgggtcaaggt accccggcgc ccgctccagg cgacacaggt aagaacaaag	420
gcgatgaggg cagccagcct agttctggcg gtaatatccc aacaaagcca gccacaacga	480
cgtcaacgag cacggatgat acgactgac gtaatggcca acatacatcc ggtaaggagg	540
cattacccaa gacagcagag acaactgagc ggccagcgtt tggcttcttg ggtgtcattg	600
tggtcagtct gatgggggta ttag	624

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene una bacteria láctica que comprende una bacteria láctica que tiene un polipéptido en una superficie de la misma, en la que el polipéptido es una proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH) de tipo salvaje o un mutante de la proteína E7 donde los residuos aminoácidos implicados en la unión con una proteína de retinoblastoma (Rb) de la proteína E7 se han sustituido por otros residuos aminoácidos, donde el polipéptido está fusionado con una proteína de anclaje que es una proteína de unión a la pared celular cA de AcmA para formar una proteína de fusión o se expresa a partir de una secuencia de un ácido nucleico que codifica el polipéptido que está ligado a un gen de anclaje prtP, donde el polipéptido está incluido en una cantidad de 0,03 µg a 1,0 µg por 1×10^8 bacterias lácticas en la superficie de la bacteria.
2. Composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína E7 del VPH es la proteína E7 de VPH16.
3. Composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el polipéptido es una proteína E7 mutante en la que Asp en la posición 21, Cys en la posición 24 y Glu en la posición 26 de una proteína E7 de VPH16 de tipo salvaje (SEQ ID NO. 1) se sustituyen por otros residuos aminoácidos.
4. Composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que tanto Asp en la posición 21, como Cys en la posición 24 y como Glu en la posición 26 de una proteína E7 de VPH16 de tipo salvaje (SEQ ID No. 1) se sustituyen por Gly.
5. Composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido se une a la superficie de las bacterias lácticas.
6. Composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido se expresa en la superficie de las bacterias lácticas.
7. Composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la bacteria láctica es *Lactobacillus casei*.
8. Composición farmacéutica oral terapéutica para su uso en el tratamiento de al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH, comprendiendo la composición la composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que al menos una de una enfermedad infecciosa por VPH y un tumor asociado a VPH es al menos uno de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer de cuello uterino en fase temprana.
10. Agente inductor de inmunidad de las mucosas que comprende la composición que contiene una bacteria láctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el agente es para su uso para proporcionar inmunidad de las mucosas contra una infección por VPH.

FIG. 1A



cA Gen AcmA de *Lactococcus lactis* IL1403

E7Rb gen E7 del virus del papiloma humano

FIG. 1B

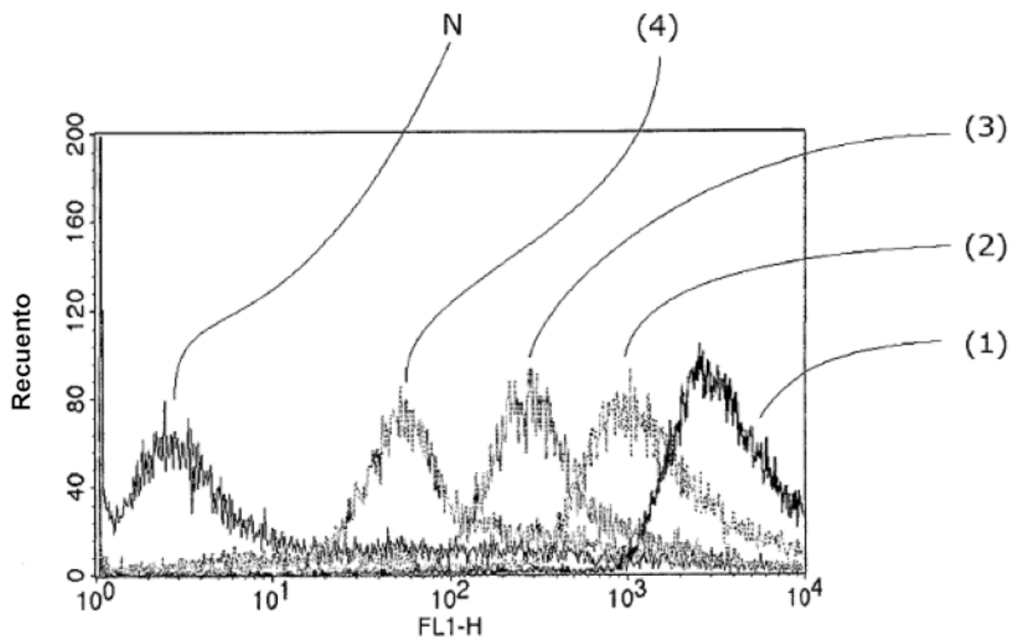


FIG. 1C

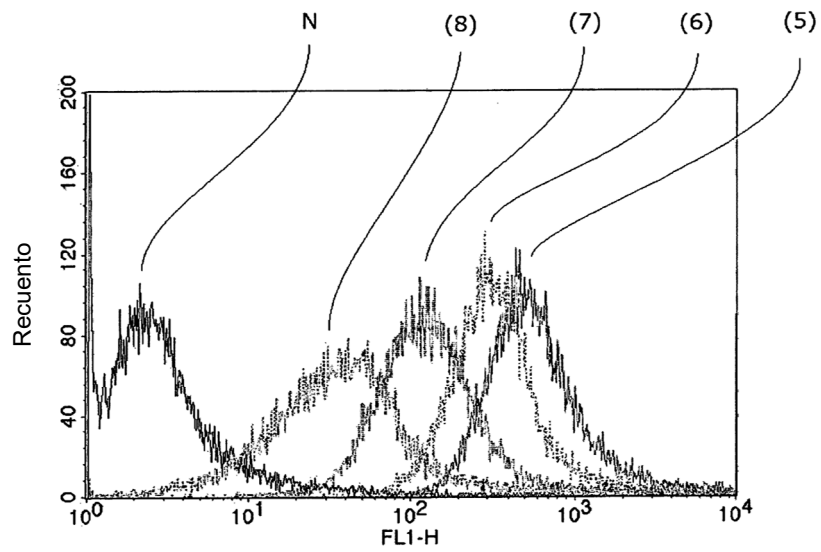


FIG. 1D

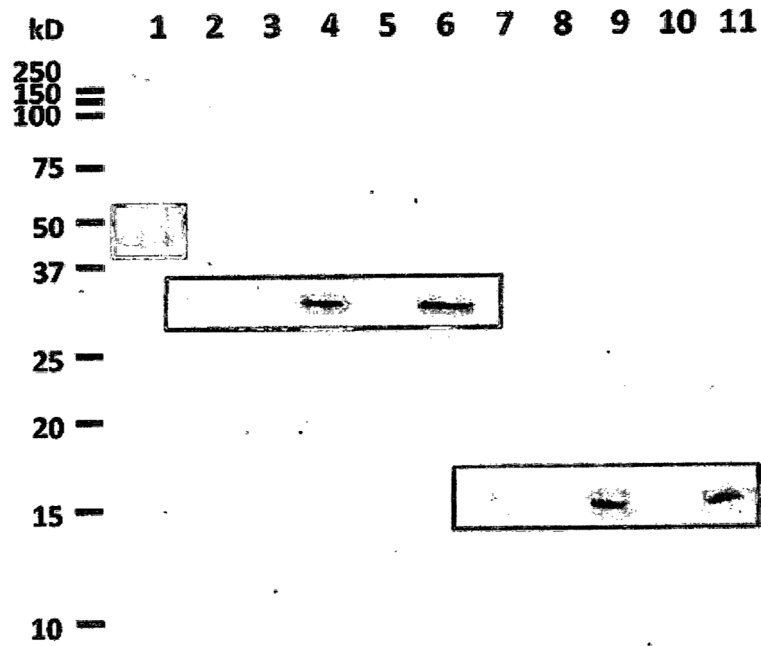
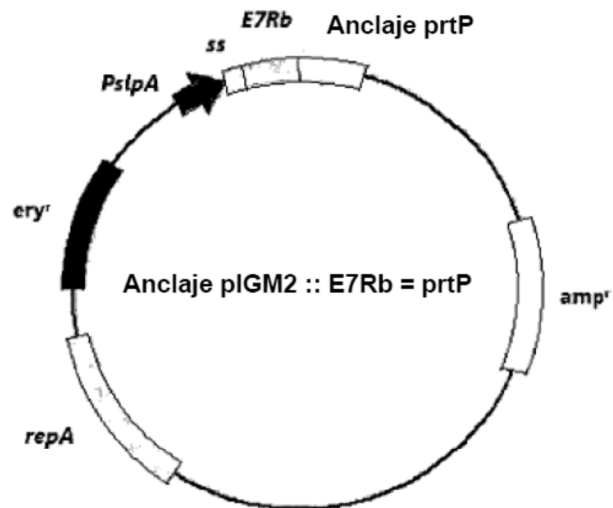


FIG. 2A



PslpA secuencia promotora de la proteína de capa S de *Lactobacillus brevis* ATCC1559

ss señal de secreción del gen *prtP* de *Lactobacillus brevis* ATCC1559

E7Rb gen E7 del virus del papiloma humano

Anclaje secuencia de proteinasa de *Lactobacillus casei*

amp^r gen resistente a la ampicilina de plásmido pGE-3

ery^r gen resistente a la eritromicina de plásmido de estafilococo áureo pE194

FIG. 2B

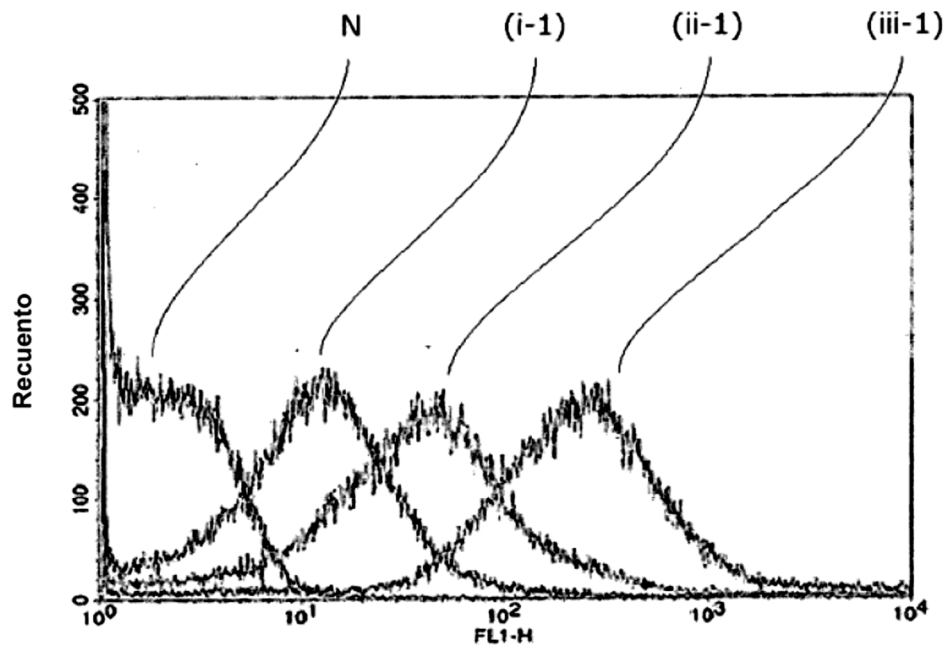


FIG. 3A

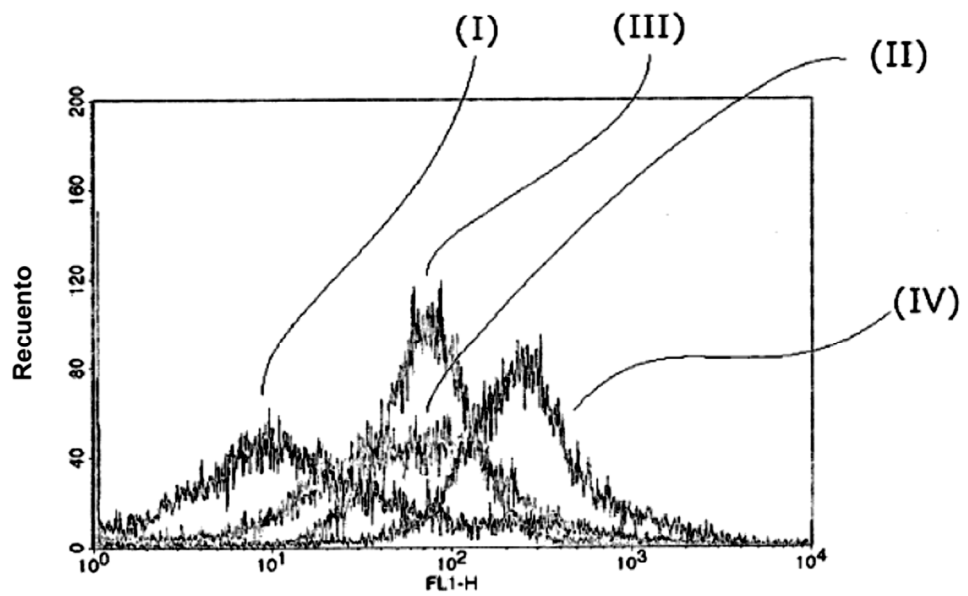


FIG. 3B

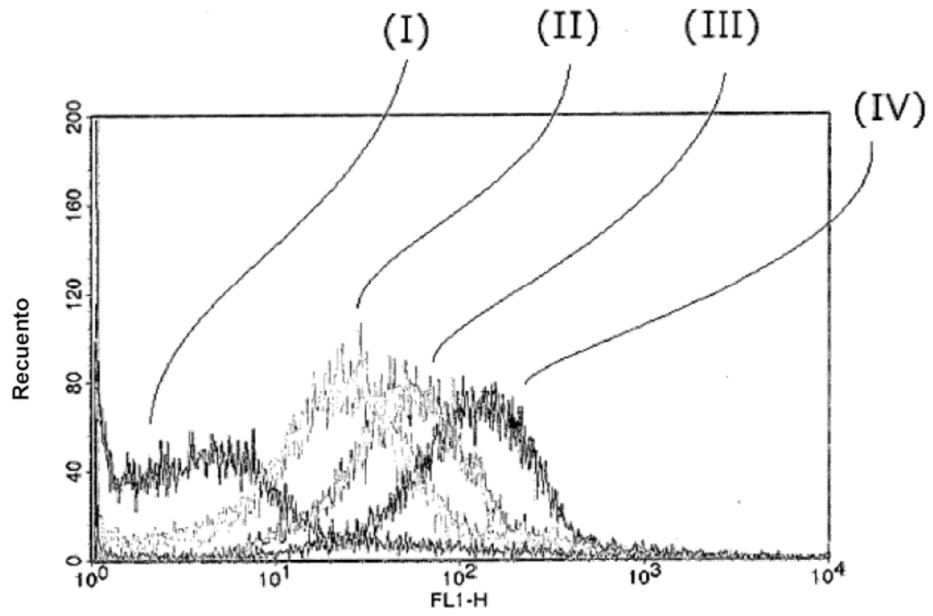


FIG. 4

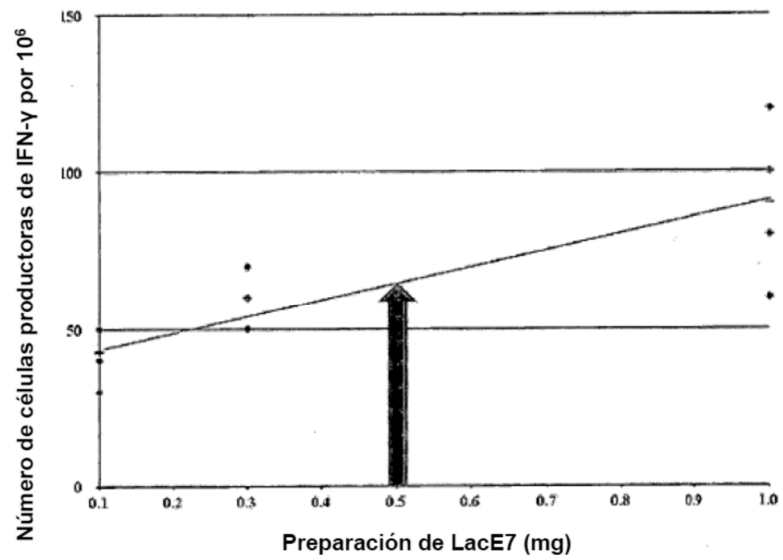


FIG. 5

