



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0710242-9 A2**

(22) Data de Depósito: 17/04/2007
(43) Data da Publicação: 09/08/2011
(RPI 2118)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/025 2006.01

(54) Título: **USO DE UMA COMPOSIÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 21/04/2006 EP 06360013.4

(73) Titular(es): Transgène S.A.

(72) Inventor(es): Ronald Rooke, Stéphane Paul

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007003367 de 17/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/121894de
01/11/2007

(57) Resumo: USO DE UMA COMPOSIÇÃO A presente invenção diz respeito ao uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de papilomavírus humano (HPV)- 18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV- 18 para a fabricação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus que não HPV- 18. A invenção é de interesse muito especial na imunoterapia, em particular na prevenção ou tratamento de infecções persistentes de HPV que levam possivelmente a neoplasia intraepitelial cervical (CIN) e ultimamente ao câncer cervical.

“USO DE UMA COMPOSIÇÃO”

A presente invenção diz respeito ao uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de papilomavírus humano (HPV)-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 para a fabricação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus que não HPV-18. A invenção é de interesse muito especial na imunoterapia, em particular na prevenção ou tratamento de infecções persistentes de HPV que levam possivelmente a neoplasia intraepitelial cervical (CIN) e ultimamente ao câncer cervical.

Os papilomavírus são vírus de DNA pequeno que foram identificados em diversos organismos superiores incluindo seres humanos (ver, por exemplo, Pfister, 1987, em *The papovaviridae: The Papillomavirus*, Salzman and Howley edition, Plenum Press, New York, p 1-38). Estes estão associados com condições patológicas que variam de tumores benignos a malignos. Em tumores benignos, o genoma viral é episossomal enquanto em tumores malignos, DNA DE HPV está integrado nos cromossomos do hospedeiro (Stoler, 2000, Int. J. Gynecol. Path. 19, 16-28).

Os papilomavírus possuem um DNA circular de filamento duplo de cerca de 7900 pares de base que é circundado por um capsídeo de proteína. O genoma compreende uma região (E) precoce contendo as estruturas de leitura E1-E7 e uma região (L) posterior. A região posterior codifica as proteínas L1 e L2 estruturais que formam o capsídeo viral visto que os genes precoces codificam proteínas reguladoras que são observadas predominantemente no núcleo. E1 codifica duas proteínas importantes na manutenção e replicação do genoma viral. E2 codifica as proteínas ativadoras e repressoras que regulam o promotor viral que direciona a transcrição de E6 e E7 (Bechtold et al., 2003, J. Virol. 77, 2021-2028). A proteína codificada

por E4 que liga e rompe a rede de queratina citoplásmica e pode desempenhar um papel na maturação viral. O papel para a proteína E5 ainda é controverso e sua expressão é freqüentemente perdida durante a integração viral nos cromossomos do hospedeiro. Os produtos genéticos codificados por E6 e E7 de genótipos de HPV associados com câncer estão envolvidos na transformação oncogênica de células infectadas (Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613; Vousden et al., 1988, Oncogene Res. 3, 1-9; Bedell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635-3640), que ocorre de maneira presumível devido à capacidade destas proteínas virais para ligar os produtos genéticos supressores de tumor celular p53 e retinoblastoma (Rb), respectivamente. Os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do polipeptídeo HPV-16 E6 natural ao p53 foram claramente definidos a partir dos resíduos 118 a 122 (+1 sendo o primeiro resíduo Met ou de resíduos 111 a 115 começando preferivelmente do segundo resíduo Met usado) (Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556) e aqueles envolvidos na ligação do polipeptídeo E7 do HPV-16 to Rb estão localizados a partir dos resíduos 21 a 26 (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446). Trais regiões de ligação também são conservadas em E6 e E7 de HPV-18 (Pim et al., 1994, Oncogene 9, 1869-1876; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446).

Atualmente, mais de 100 genótipos de papilomavírus humano (HPV) foram clonados e seqüenciados (Stoler, 2000, Int. J. Gynecol. Path 19, 16-28). Apenas 40 genótipos de HPV infectam a mucosa genital com cerca de 15 dos quais colocam a mulher em risco de tumores malignos do trato genital. Mais especificamente, os dois genótipos mais prevalentes, HPV-16 e HPV-18, são detectados em mais do que 70% do carcinoma cervical invasivo visto que HPV-31, HPV-33 e HPV-45 juntos, respondem por 10% dos casos (Cohen et al., 2005, Science 308, 618-621).

Embora programas de avaliação cervical existam, quase meio

milhão de mulheres no mundo todo são diagnosticadas com cânceres cervicais cada ano e mais do que 270.000 morrem de acordo com os dados da International Agency for Research on cancer. Os métodos convencionais permanecem cirurgia e radioterapia, mas novas estratégias de vacina foram

5 projetadas nos últimos 15 anos, por exemplo, vacinas com base em peptídeo (Feltkamp et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23, 2242-2249), vacinas de partículas semelhantes a vírus (VLP), vacinas de DNA (Osen et al, 2001, Vaccine 19, 4276-4286; Smahel et al., 2001, Virology 281, 231-238) e vacinas de vetor viral (EP 462,187, Daemen et al., 2000, Gene Ther. 7: 1859-1866; He et al.,

10 2000, Virology 270, 146-161; Borysiewicz et al., 1996, Lancet 347, 1523-1527).

Conceitualmente, existem dois métodos para vacinas contra HPV, profilático e terapêutico. O método profilático busca evitar a infecção viral, isto é, bloquear o vírus antes deste penetrar nas células hospedeiras

15 principalmente através da indução de anticorpos neutralizadores. Usualmente, as vacinas profiláticas alvejam as proteínas capsídicas expressadas na superfície viral. Maioria destes contam com VLPs produzidos recombinantemente de proteínas de LP1 ou mistura de VLPs dos maioria dos tipos de HPV prevaescentes. Ensaios clínicos de fase III bem sucedidos

20 foram recentemente relatados por Merck and GlaxoSmithKline (GSK) com eficácia de 100% na prevenção de infecções cervicais do tipo específico). A proteção cruzada contra genótipos de HPV-31 e HPV-45 oncogênicos foi descrita seguindo a administração de uma mistura de VLPs de HPV-16 e HPV-18 (WO 2004/056389). Entretanto, as vacinas preventivas com base em

25 VLP não são esperadas induzir a regressão de condições patológicas que desenvolvem a seguinte infecção por HPV.

O método terapêutico procura tratar infecções por HPV estabelecidas e induzem a regressão de condições patológicas pré-cancerosas e cancerosas associadas com o HPV principalmente através da indução de

uma resposta imune celular. Usualmente, a estratégia terapêutica conta com a imunização direcionada a oncoproteínas E6 e/ou E7 que são expressadas pelas células tumorais induzidas por HPV. Até agora, a imunidade fornecida pelos antígenos de HPV E6 e E7 é considerada específica do genótipo e as vacinas terapêuticas correntes no desenvolvimento clínico ou pré-clínico focam principalmente no HPV-16 oncogênico mais prevalente e a uma extensão menor HPV-18.

Entretanto, uma vacina terapêutica ideal deve permitir fornecer proteção não apenas contra os genótipos de HPV mais prevalentes mas também contra os outros genótipos menores de HPV envolvido nos 30% remanescentes de cânceres cervicais. Isto pode ser atingido através do desenvolvimento de candidatos a vacina alternativos direcionados a cada um dos genótipos oncogênicos de HPV. Entretanto, esta estratégia, provavelmente, não deve ser muito atrativa em consideração do custo de desenvolvimentos clínicos e pré-clínicos requeridos por autoridades reguladoras versus o número limitado de pacientes expostos aos genótipos menores de HPV.

Pode-se esperar que o HPV continuará a ser uma séria ameaça à saúde global por muito anos devido à natureza persistente e crônica da infecção, seu predomínio alto e a morbidez significativa de Cânceres induzidos por HPV. Portanto, existe uma necessidade de desenvolver uma vacina que ofereça uma cobertura mais ampla que seja capaz de proteger e/ou tratar contra genótipos múltiplos de HPV incluindo, além disso, HPV-18 outros genótipos menores e potencialmente oncogênicos de HPV.

Desta maneira, a presente invenção representa um avanço significativo para melhorar a prevenção e o tratamento de infecções por papilomavírus ou lesões malignas ou pré-malignas associadas com o papilomavírus em países industrializados, bem como em países em desenvolvimento.

Este problema técnico é resolvido pelo fornecimento das formas de realização como definido nas reivindicações.

Outros aspectos e aspectos adicionais, características e vantagens da presente invenção estarão evidentes a partir do seguinte relatório descritivo das formas de realização presentemente preferidas da invenção. Estas formas de realização são dadas para o propósito de divulgação.

Conseqüentemente, em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 para a fabricação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus que não HPV-18.

Mais particularmente, a presente invenção diz respeito ao uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 para a fabricação de um medicamento para tratar uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18. A presente invenção também diz respeito a um método de tratar uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18, o método compreendendo administrar a um organismo hospedeiro, uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18.

Como usado aqui por todo o pedido, os termos “um” e “uma” são usados no sentido de que este significa “pelo menos um”, “pelo menos um primeiro”, “um ou mais” ou “uma pluralidade” dos compostos ou etapas referidos, a não ser que o contexto dite de outra maneira. Por exemplo, o

termo “uma célula” inclui uma pluralidade de células incluindo uma mistura destes. mais especificamente, “pelo menos um” and “um ou mais” significa um número que é um ou maior do que um, com uma preferência especial por um, dois ou três.

5 O termo “e/ou” usado em qualquer parte deste inclui o significado de “e”, “ou” e “todas ou quaisquer outras combinações dos elementos conectados pelo dito termo”.

O termo “cerca de” ou “aproximadamente” como usado neste significa dentro de 20%, preferivelmente dentro de 10% e mais
10 preferivelmente dentro de 5% de um dado valor ou faixa.

O termo “aminoácidos” e “resíduos” são sinônimos. Estes termos referem-se a aminoácidos naturais, não naturais e/ou sintéticos, incluindo isômeros óticos D ou L, aminoácidos modificados e análogos de aminoácido.

15 Os termos “polipeptídeo”, “peptídeo” e “proteína” são usados neste de maneira intercambiável para referir-se a polímeros de resíduos de aminoácido que compreendem nove ou mais aminoácidos ligados por intermédio de ligações de peptídeo. O polímero pode ser linear, ramificado ou cíclico e pode compreender análogos de ocorrência natural e/ou de
20 aminoácidos e estes podem ser interrompidos por não-aminoácidos. Como uma indicação geral, se o polímero de aminoácido for longo (por exemplo, mais do que 50 resíduos de aminoácido), este é preferivelmente referido como um polipeptídeo ou uma proteína.

Dentro do contexto da presente invenção, os termos “ácido
25 nucleico”, “molécula de ácido nucleico”, “polinucleotídeo” e “seqüência de nucleotídeo” são usados de maneira intercambiável e definem um polímero de qualquer comprimento de polidesoxiribonucleotídeos (DNA) (por exemplo, cDNA, DNA genômico, plasmídeos, vetores, genomas virais, DNA isolado, sondas, iniciadores e quaisquer misturas destes) ou moléculas de

polirribonucleotídeos (RNA) (por exemplo, mRNA, RNA anti-sentido) ou polirribo-polidesoxiribinucleotídeos mistos. Estes abrangem polinucleotídeos de filamento simples ou duplo, linear ou circular, natural ou sintético. Além disso, um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos que não ocorrem naturalmente, tais como nucleotídeos metilados e análogos de nucleotídeo (ver US 5.525.711, US 4.711.955 ou EPA 302 175 como exemplos de modificações) e podem ser interrompidos por componentes não-nucleotídeos. Se presente, modificações ao nucleotídeo podem ser comunicadas antes ou após a polimerização.

Como usado neste, o termo “que compreende” quando usado para definir produtos, composições e métodos, é pretendido significar que os produtos, composições e métodos incluem os compostos ou etapas referidos, mas não excluindo outros. “Consistindo essencialmente de” deve significar excluindo outros compostos ou etapas se houver qualquer significância essencial. Desta maneira, a composição que consiste essencialmente dos compostos citados não deve excluir contaminantes traço e carregadores farmacologicamente aceitáveis. “Consistindo de” deve significar excluindo mais do que elementos traço de outros compostos ou etapas. Por exemplo, um polipeptídeo “consiste de” uma sequência de aminoácido quando o polipeptídeo não contém quaisquer aminoácidos mas a sequência de aminoácido citada. Um polipeptídeo “consiste essencialmente de” uma sequência de aminoácido quando uma tal sequência de aminoácido está presente junto com apenas alguns resíduos de aminoácido adicionais, tipicamente de cerca de 1 a cerca de 50 ou ainda resíduos adicionais. Um polipeptídeo “compreende” uma sequência de aminoácido quando a sequência de aminoácido é pelo menos parte da sequência de aminoácido final do polipeptídeo. Um tal polipeptídeo pode ter de alguns a diversas centenas de resíduos de aminoácidos adicionais. Tais resíduos de aminoácido adicionais podem desempenhar um papel em tráfego de polipeptídeo, facilitar a

produção ou purificação de polipeptídeo; prolongar a vida média, entre outras coisas. O mesmo pode ser aplicado às seqüências de nucleotídeo.

5 Como usado neste, o termo “isolado” refere-se a uma proteína, polipeptídeo, peptídeo ou um ácido nucleico que é purificado ou removido de seu ambiente natural. O termo “purificado” refere-se a uma proteína, polipeptídeo, peptídeo ou um ácido nucleico que é separado de pelo menos um outro componente com o qual este está naturalmente associado.

10 O termo “célula hospedeira” deve ser entendido amplamente sem qualquer limitação com respeito à organização particular em tecido, órgão ou células isoladas. Tais células podem ser de um tipo único de células ou um grupo de tipos diferentes de células e abrange linhas celulares cultivadas, células primárias e células proliferativas. O termo “organismo hospedeiro” refere-se a um vertebrado, particularmente um membro das espécies de mamíferos e, especialmente, animais domésticos, animais
15 esportivos e primatas incluindo seres humanos.

“HPV” significa “papilomavírus humano”. Sua classificação é fundamentada no grau de relação de seus genomas. Mais do que 100 genótipos de HPV foram identificados no presente período e estes foram numerados seguindo a ordem cronológica de seu isolamento. Por convenção,
20 dois isolados constituem tipos distintos se estes dividirem menos do que 90% identidade em torno de cerca de porção longa de 2000 nucleotídeos de seu genoma contendo as estruturas de leitura aberta E6, E7 and L1. Uma árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento da seqüência de nucleotídeo disponível (Van Ranst et al., 1992, J. Gen. Virol. 73, 2653; De
25 Villiers et al., 2004, Virology 324, 17-27).

Como usado neste o termo “polipeptídeo precoce” refere-se a uma proteína não estrutural reconhecida na técnica, preferivelmente selecionado dentre o grupo consistindo de polipeptídeos E1, E2, E4, E5, E6 e E7. No contexto da invenção, o um ou mais polipeptídeos precoces incluídos

na composição ou codificados pelo ácido nucleico incluído na composição usada de acordo com a invenção origina-se de HPV-18. O termo “origina-se” significa ser isolado, clonado, derivado ou relacionado. Desta maneira, de acordo com a presente invenção, o um ou mais polipeptídeos de HPV-18 precoces podem originar-se de um polipeptídeo de HPV-18 precoce natural ou de um derivado destes. A “polipeptídeo de HPV-18 precoce natural” refere-se a uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo que pode ser encontrada ou isolada de uma fonte na natureza, como diferente de ser artificialmente modificada ou alterada pelo homem no laboratório. Tais fontes na natureza incluem amostras biológicas (por exemplo, sangue, plasma, soros, fluidos vaginais e cervicais, seções de tecido, biópsias, amostras ginecológicas de pacientes infectados com HPV-18), células cultivadas, bem como materiais recombinantes (por exemplo, HPV-18 vírus ou genoma, bibliotecas genômicas ou de cDNA, plasmídeos contendo fragmentos de genoma de HPV-18, polipeptídeo HPV-18 precoce recombinante e outros). Desta maneira o termo “polipeptídeo HPV-18 precoce natural” deve incluir polipeptídeos de HPV-18 precoces de ocorrência natural e fragmentos destes. Um fragmento é preferivelmente de pelo menos 9 resíduos de aminoácido e compreende pelo menos um epítipo imunogênico e particularmente um epítipo T. tais fragmentos podem ser usados de maneira independente ou em combinação (por exemplo, em fusão). O nucleotídeo e as seqüências de genes precoces de aminoácido de HPV-18 / polipeptídeos foram descritos na literatura e estão disponíveis em bancos de dados especializados, por exemplo em Genbank sob número de acesso NC_001357 e X05015, respectivamente. Entretanto, polipeptídeos HPV-18 precoces naturais não são limitados a estas seqüência exemplares. De fato as seqüências de aminoácido podem variar entre isolados de HPV-18 diferentes e seu escopo natural de variação genética está incluído dentro do escopo da invenção.

Um derivado de um polipeptídeo de HPV-18 precoce inclui

uma ou mais modificações com respeito ao polipeptídeo de HPV-18 precoce natural, tal como aqueles definidos abaixo. As modificações podem ser geradas por meio de mutação e/ou adição de porções químicas (por exemplo, alquilação, acetilação, amidação, fosforilação e outros) ou porções de rotulação. Mutação inclui anulação, substituição ou adição de um ou mais resíduos de aminoácido ou quaisquer combinações destas possibilidades. Quando diversas modificações são consideradas, estes podem dizer respeito a resíduos consecutivos e/ou resíduos não consecutivos. As modificações podem ser feitas em diversas maneiras conhecidas por aqueles habilitados na técnica, tais como mutagênese direcionada ao local (por exemplo, usando-se o sistema de mutagênese in vitro Sculptor of Amersham, Les Ullis, France), Mutagênese de PCR e Mistura de DNA.

Vantajosamente, um polipeptídeo de HPV-18 precoce modificado retém um alto grau de identidade de seqüência de aminoácido com o polipeptídeo HPV-18 precoce natural correspondente na seqüência de aminoácido de comprimento total ou um fragmento mais curto deste (por exemplo, de pelo menos 9, 20, 30, 40, 50, 100 aminoácidos de comprimento), que é maior do que 75%, vantajosamente maior do que 80%, desejavelmente maior do que 85%, preferivelmente maior do que 90%, mais preferivelmente maior do que 95%, ainda mais preferivelmente maior do que 97% (por exemplo, 100% de identidade de seqüência). A identidade percentual entre dois polipeptídeos é uma função do número de posições idênticas divididas pelas seqüências, levando em conta o número de fendas que necessitam ser introduzidas para o alinhamento ótimo e o comprimento de cada fenda. Vários programas de computador e algoritmos matemáticos estão disponíveis na técnica para determinar as identidades de percentagem entre as seqüências de aminoácido tais como, por exemplo o software W2H HUSAR e o programa Blast (por exemplo, Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402; Altschul et al., 2005, FEBS J. 272, 5101-5109) disponível em NCBI.

Desejavelmente, o polipeptídeo de HPV-18 precoce modificado no uso de acordo com a invenção retêm atividade imunogênica do polipeptídeo HPV-18 precoce natural tal como a capacidade de estimular uma resposta imune mediada por célula.

5 Em uma forma de realização, a composição é usada para tratar infecção por HPV e/ou condições patológicas, especialmente no trato anogenital, a pele ou a cavidade oral, causado por pelo menos um outro genótipo de HPV que não HPV-18. Em um aspecto, o genoma do pelo menos um papilomavírus humano divide menos do que 90%, vantajosamente menos do que 87% e, desejavelmente menos do que 86% de identidade de seqüência de nucleotídeo com a porção do genoma de HPV-18 que codifica os polipeptídeos E6 ou E7 mas mais do que 50%, vantajosamente mais do que 55% e, desejavelmente mais do que 60% de identidade de seqüência de nucleotídeo com a porção do genoma de HPV-18 que codifica os polipeptídeos E6 ou E7. Preferivelmente este divide de aproximadamente 61% a aproximadamente 86% de identidade de nucleotídeo com os ORFs de E6 ou E7 de HPV. A identidade percentual entre as porções dos Genomas de HPV é uma função do número de posições idênticas dividido pelas duas seqüências, levando em conta o número de fendas que necessitam ser introduzidas para o alinhamento ótimo e o comprimento de cada fenda. Vários programas de computador e algoritmos matemáticos estão disponíveis na técnica para determinar as identidades de percentagem entre seqüências de nucleotídeo. Exemplos representativos de tais genótipos de HPV incluem, sem limitação HPV-13, HPV-18, HPV-30, HPV-32, HPV-39, HPV-40, HPV-42, HPV-44, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-61, HPV-64, HPV-68, HPV-70 e HPV-85.

Preferivelmente, o pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18 é selecionado dentre o grupo que consiste de HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70 e HPV-85 ou

qualquer combinação possível destes, com uma preferência especial por HPV-45. O nucleotídeo e as seqüências de aminoácido destes genótipos de HPV foram descritos na literatura e estão disponíveis em bancos de dados especializados, como ilustrado na Tabela I.

5

Tabela I: Números de acesso Genbank

HPV 18	X05015
HPV 39	M62849
HPV 45	X74479
HPV 51	NC_001533
HPV 56	X74483
HPV 59	NC_001635 (X77858)
HPV 68	X67161
HPV 70	U21941
HPV 85	AF131950

Em uma outra forma de realização, a composição usada de acordo com a invenção compreende ou codifica um polipeptídeo E6 de HPV-18, um polipeptídeo E7 de HPV-18 ou tanto um polipeptídeo E6 de HPV-18 quanto um polipeptídeo E7 de HPV-18. Dadas as observações redenominadas acima na energia de transformação dos polipeptídeos E6 e polipeptídeo E7, polipeptídeos E6 e/ou polipeptídeos E7 de HPV-18 modificados são preferivelmente usados sendo variantes não oncogênicas mutadas na região envolvida na interação com os produtos genéticos supressores de tumor celular p53 e Rb respectivamente. A presente invenção abrange o uso de qualquer polipeptídeo E6 de HPV-18 que liga-se ao p53 é alterado ou pelo menos significantemente reduzido e/ou o uso de qualquer polipeptídeo de HPV-18 E7 que liga-se ao Rb é alterado ou pelo menos significantemente reduzido (Pim et al., 1994, Oncogene 9, 1869-1876; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446). Uma variante E6 de HPV-18 não oncogênica que é adequada para o propósito da presente invenção é anulada de um ou mais resíduos de aminoácido localizados aproximadamente da posição 113 aproximadamente da posição 117 (começando do primeiro resíduo de metionina do polipeptídeo E6 de HPV-18), com uma preferência especial pela anulação completa dos resíduos 113 a 117 (NPAEK). A variante

10

15

20

oncogênica mais preferida do polipeptídeo E6 de HPV-18 compreende ou, alternativamente, consiste essencialmente de, ou, alternativamente, consiste de uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 1. Uma variante E7 de HPV-18 não oncogênica que é adequada para o propósito da presente invenção é anulada de um ou mais resíduos de aminoácido localizados aproximadamente da posição 24 aproximadamente da posição 28 (+1 que representa o primeiro aminoácido do polipeptídeo E7 de HPV-18 natural), com uma preferência especial pela anulação completa dos resíduos 24 a 28 (DLLCH). A variante oncogênica mais preferida do polipeptídeo E7 de HPV-18 compreende ou, alternativamente, consiste essencialmente de, ou, alternativamente, consiste de uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 2.

Em um aspeto preferido, o um ou mais polipeptídeos de HPV-18 precoces em uso na invenção ainda são modificados a fim de melhorar apresentação da classe MHC I e/ou classe MHC II, e/ou para estimular a imunidade anti-HPV. HPV-18 E6 and polipeptídeo E7s são proteínas nucleares e estas mostraram que apresentação de membrana permite melhorar a eficácia terapêutica dos polipeptídeos de HPV-16 correspondentes (ver, por exemplo, WO99/03885). Desta maneira, pode ser desejável modificar pelo menos um dos polipeptídeos de HPV-18 precoce a fim de ser ancorado à membrana celular. A ancoragem de membrana pode ser facilmente atingida pela incorporação no polipeptídeo de HPV-18 precoce uma seqüência de ancoragem de membrana e se o polipeptídeo natural precisa de uma seqüência secretora (isto é, um peptídeo sinalizador). Os polipeptídeos E6 e/ou polipeptídeos E7 de HPV-18 e são preferivelmente modificados pela incorporação de uma seqüência de ancoragem de membrana e uma seqüência secretora. A ancoragem de membrana e as seqüências secretoras são conhecidas na técnica. Resumidamente, as seqüências secretoras estão

presentes no terminal N da membrana apresentada ou polipeptídeos secretados e iniciam sua passagem no retículo endoplásmico (ER). Estes usualmente compreendem de 15 a 35 aminoácidos essencialmente hidrofóbicos que são então removidas por uma endopeptidase localizada em ER específica para dar o polipeptídeo maduro. As seqüências de ancoragem de membrana são, usualmente, altamente hidrofóbicas em estado natural e servem para ancorar os polipeptídeos na membrana celular (ver, por exemplo, Branden and Tooze, 1991, em Introduction to Protein Structure p. 202-214, NY Garland).

A escolha da ancoragem de membrana e seqüências secretoras que podem ser usadas no contexto da presente invenção é vasta. Estes podem ser obtidos a partir de qualquer polipeptídeo ancorado na membrana e/ou secretado que o compreende (por exemplo, polipeptídeos celulares e/ou virais) tal como a glicoproteína da hidrofobia, da glicoproteína do envelope do vírus HIV ou da proteína F do vírus do sarampo ou pode ser sintético. A ancoragem de membrana e/ou seqüências secretoras inseridas em cada um dos polipeptídeos de HPV-18 precoces usados de acordo com a invenção pode ter uma origem comum ou diferente. O local preferido de inserção da seqüência secretora é o terminal N a jusante do códon para o início da tradução e aquele da seqüência de ancoragem de membrana é o terminal C, por exemplo imediatamente a montante do códon de interrupção. Além disso, um peptídeo ligador pode ser usado para conectar a seqüência secretora ao polipeptídeo de HPV-18 precoce em uso na invenção ou para conectar o polipeptídeo de HPV-18 precoce à seqüência de ancoragem de membrana. Os peptídeos ligadores são conhecidos na técnica. Tipicamente, estes contêm de 2 a 20 aminoácidos e incluem alanina, glicina, prolina e/ou serina.

O polipeptídeo E6 de HPV-18 em uso na presente invenção é preferivelmente modificado pela inserção dos sinais secretores e de ancoragem de membrana da proteína F do sarampo, com uma preferência

especial por um polipeptídeo que compreende ou, alternativamente, consistindo essencialmente de, ou, alternativamente, consistindo de uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 3. Opcionalmente ou em combinação, o

5 polipeptídeo E7 de HPV-18 em uso na presente invenção é preferivelmente modificado pela inserção dos sinais secretores e de ancoragem de membrana da glicoproteína da raiva, com uma preferência especial para um polipeptídeo que compreende ou, alternativamente, consistindo essencialmente de, ou, alternativamente, consistindo de uma seqüência de aminoácido que é

10 homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 4.

Em um outro e mais preferido aspecto, a eficácia terapêutica da composição em uso na invenção pode ser melhorada pelo uso de um ou mais polipeptídeos imunopotenciadores ou um ou mais ácidos nucleicos que codificam tais polipeptídeos imunopotenciadores. Por exemplo, pode ser

15 vantajoso ligar os polipeptídeos de HPV-18 precoces a um polipeptídeo, tal como calreticulina (Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108, 669-678), Proteína de choque por calor de Mycobacterium tuberculosis 70 (HSP70) (Chen et al., 2000, Cancer Res. 60, 1035-1042), ubiquitina (Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71, 8497-8503) ou uma toxina bacteriana tal como o domínio de

20 translocação de Exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa (ETA(dIII)) (Hung et al., 2001 Cancer Res. 61, 3698-3703). Alternativamente, a composição em uso na presente invenção ainda pode compreender uma citocina ou um ácido nucleico que codifica uma citocina. Citocinas adequadas incluem, sem limitação interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21 e IFN γ , com uma

25 preferência especial por IL-2.

De acordo com uma outra forma de realização ou preferida, a composição no uso de acordo com a invenção compreende um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos de HPV-18 precoces como definido acima. É preferido um ácido nucleico que codifica pelo menos:

○ um polipeptídeo E6 de HPV-18 que compreende ou, alternativamente, consistindo essencialmente de, ou, alternativamente, consistindo de uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 1 ou SEQ ID N°: 3; and

- 5 ○ um polipeptídeo de HPV-18 E7 que compreende ou, alternativamente, consistindo essencialmente de, ou, alternativamente, consistindo de uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 2 ou SEQ ID N°: 4.

Se necessário, a molécula de ácido nucleico em uso na
10 invenção pode ser otimizada para fornecer expressão de alto nível dos polipeptídeos de HPV-18 precoces em uma célula hospedeira ou organismo particular, por exemplo, uma célula hospedeira ou organismo humano. Tipicamente, a otimização de códon é realizada pela substituição um ou mais códon “em estado natural” (por exemplo, HPV) correspondente a um códon
15 usado de maneira não freqüente na célula hospedeira de mamífero por um ou mais códons que codificam o mesmo aminoácido que é mais freqüentemente usado. Isto pode ser atingido pela mutagênese convencional ou pelas técnicas sintéticas químicas (por exemplo, resultando em um ácido nucleico sintético). Não é necessário substituir todos os códons naturais correspondentes aos
20 códons usados de maneira não freqüente visto que a expressão aumentada pode ser atingida mesmo com a substituição parcial. Além disso, alguns desvios de aderência estritos ao uso de códon otimizado podem ser feitos para acomodar a introdução de locais de restrição.

Preferivelmente, o ácido nucleico codificador de polipeptídeo
25 de HPV-18 precoce em uso na invenção está em uma forma adequada para a sua expressão em uma célula hospedeira ou organismo, significando que a seqüência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo E6 e/ou a seqüência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo E7 são colocados sob o controle de um ou mais elementos reguladores necessários para a expressão na célula

hospedeira ou organismo. Como usado neste, o termo “elemento regulador” refere-se a qualquer seqüência que permite, contribui ou modula a expressão do ácido nucleico em uma dada célula hospedeira, incluindo replicação, duplicação, transcrição, união, tradução, estabilidade e/ou transporte do ácido nucleico ou um de seus derivados (isto é, mRNA) na célula hospedeira. Será estimado por aquele habilitado na técnica que a escolha dos elementos reguladores pode depender de fatores, tais como a célula hospedeira, o vetor e o nível de expressão desejado.

O promotor é de importância especial e a presente invenção abrange o uso de promotores constitutivos que direcionam a expressão do ácido nucleico em muitos tipos de células hospedeiras e aqueles que direcionam a expressão apenas em certas células hospedeiras ou em resposta aos eventos específicos os fatores exógenos (por exemplo, por temperatura, aditivo de nutriente, hormônio ou outro ligando). Os promotores adequados são amplamente descritos na literatura e pode-se citar mais especificamente promotores virais, tais como RSV (Vírus do Sarcoma de Rous), SV40 (Vírus Símio-40), CMV (Citomegalo Vírus) e promotores de MLP (promotor Tardio Principal). Promotores preferidos para o uso em um vetor poxviral incluem, sem limitação promotores de vaccinia 7.5K, H5R, TK, p28, p11 e K1L, promotores quiméricos entre promotores poxvirais precoces e tardios bem como promotores sintéticos tais como aqueles descritos em Chakrabarti et al. (1997, *Biotechniques* 23, 1094-1097), Hammond et al. (1997, *J. Virological Methods* 66, 135-138) and Kumar and Boyle (1990, *Virology* 179, 151-158).

Aqueles habilitados na técnica estimarão que os elementos reguladores controlam a expressão do ácido nucleico ainda compreende elementos adicionais para a iniciação apropriada, regulação e/ou terminação da transcrição (por exemplo, seqüências de terminação de transcrição polyA), transporte de mRNA (por exemplo, seqüências sinalizadoras de localização nuclear), processamento (por exemplo, sinais de união), estabilidade (por

exemplo, íntrons e seqüências 5' e 3' não codificadoras) e tradução (por exemplo, seqüências líderes tripartidas, locais de ligação de ribossoma, seqüências de Shine-Dalgarno, etc.) na célula hospedeira ou organismo.

De acordo com uma outra forma de realização preferida, o ácido nucleico usado de acordo com a presente invenção é compreendido de um vetor. O termo “vetor” como usado neste refere-se a vetores virais bem como não virais (por exemplo, DNA de plasmídeo), incluindo vetores extracromossômico (por exemplo, epissoma), multicópia e integradores (isto é, para ser incorporado nos cromossomos do hospedeiro). Particularmente importante no contexto da invenção são os vetores de terapia genética (isto é, que são capazes de liberar o ácido nucleico a um organismo hospedeiro) bem como vetores de expressão para o uso em vários sistemas de expressão. Vetores não virais adequados incluem plasmídeos, tais como pREP4, pCEP4 (Invitrogene), pCI (Promega), pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840), pVAX and pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76, 12735-12746). Os vetores virais adequados podem ser derivados de uma variedade de vírus diferentes (por exemplo, retrovírus, adenovírus, AAV, poxvírus, vírus do herpes, vírus do sarampo, vírus espumoso e outros). Como usado neste, o termo “vetor viral” abrange o DNA do vetor bem como partículas virais geradas destes. Os vetores virais podem ser competentes de replicação ou podem ser geneticamente desabilitados a fim de serem defeituosos na replicação ou enfraquecidos na replicação. O termo “competentes de replicação” como usado neste abrange vetores virais seletivos de replicação e condicionalmente replicadores que são projetados para replicar melhor ou seletivamente em células hospedeiras específicas (por exemplo, células tumorais).

Em um aspecto, o vetor em uso na invenção é um vetor adenoviral (para uma revisão, ver “Adenoviral vectors for gene therapy”, 2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Press). Isto pode ser derivado a

partir de uma variedade de fontes humanas ou animais e qualquer sorotipo pode ser utilizado a partir do serotipos de adenovírus 1 até 51. Particularmente preferidos são adenovírus humanos 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), 11 (Ad11), 24 (Ad24) e 35 (Ad35). Tais adenovírus estão disponíveis a partir do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) e foram o objetivo de publicações numerosas que descrevem sua seqüência, organizações e métodos de produzir, deixando o técnico aplicá-lo (ver, por exemplo, US 6.133.028; US 6.110.735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels et al., 2003, J. Virol. 77, 8263-8271).

O vetor adenoviral em uso na presente invenção pode ser competente de replicação. Exemplos numerosos de competentes de vetores de replicação adenoviral estão facilmente disponíveis para aqueles habilitados na técnica (Hernandez-Alcoceba et al., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis et al., 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727). Por exemplo, estes podem ser projetados a partir de um genoma de adenovírus do tipo selvagem pela anulação no Domínio E1A CR2 (por exemplo, WO00/24408) e/ou pela substituição promotores E1 e/ou E4 naturais com tecido, tumor ou promotores específicos do estado celular (por exemplo, US5,998,205, WO99/25860, US5,698,443, WO00/46355, WO00/15820 e WO01/36650).

Alternativamente, o vetor adenoviral em uso na invenção é defeituoso na replicação (ver, por exemplo, WO94/28152; Lusky et al., 1998, J. Virol 72, 2022-2032). Defeituosos preferidos no vetores de replicação adenoviral são defeituosos de E1 (por exemplo, US 6,136,594 e US 6,013,638), com uma anulação de E1 que se estende aproximadamente das posições 459 a 3328 ou aproximadamente das posições 459 a 3510 (por referência à seqüência do adenovírus humano tipo 5 divulgado no GeneBank sob o número de acesso M 73260 e em Chroboczek et al., 1992, Virol. 186, 280-285). A capacidade de clonagem ainda pode ser melhorada pela anulação

das porções adicionais do genoma adenoviral (toda ou parte da região E3 não essencial ou de outras regiões E2, E4 essenciais). A inserção do ácido nucleico pode ser realizada através da recombinação homóloga em qualquer localização do genoma adenoviral como descrito em Chartier et al. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Por exemplo, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo E6 de HPV-18 pode ser inserida na substituição da região E1 e o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de HPV-18 E7 na substituição da região E3 ou *vice versa*.

Em um outro e preferido aspecto, o vetor em uso na invenção é um vetor poxviral (ver, por exemplo, Cox et al. in “Viruses in Human Gene Therapy” Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press). Isto pode ser obtido a partir de qualquer membro do poxviridae, em particular vírus canarypox, fowlpox e vaccinia, o último sendo preferido. Os vírus vaccinia adequados incluem, sem limitação a cepa Copenhagen (Goebel et al., 1990, Virol. 179, 247-266 e 517-563; Johnson et al., 1993, Virol. 196, 381-401), a cepa Wyeth e a cepa Ankara modificada altamente atenuada (MVA) (Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-16). A determinação da seqüência completa do genoma MVA e a comparação com o genoma Copenhagen permitiu a identificação precisa de sete anulações (I a VII) que ocorreu no genoma MVA (Antoine et al., 1998, Virology 244, 365-396), qualquer um dos quais pode ser usado para inserir o ácido nucleico codificador de polipeptídeo de HPV-18 precoce.

A técnica básica para a inserção do ácido nucleico e reguladores de elemento associado requeridos para a expressão em um genoma poxviral é descrito em numerosos descritos acessíveis à pessoa habilitada na técnica (Paul et al., 2002, Cancer gene Ther. 9, 470-477; Piccini et al., 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563; US 4.769.330; US 4.772.848; US 4.603.112; US 5.100.587 e US 5.179.993). Usualmente, procede-se através da recombinação homóloga entre seqüências de sobreposição (isto é, flanqueando o local de inserção desejado) presente tanto

no genoma viral e um plasmídeo que carrega o ácido nucleico para inserção.

O ácido nucleico é preferivelmente inserido em um local não essencial do genoma poxviral, a fim de que o poxvírus recombinante permaneça viável e infeccioso. As regiões não essenciais são regiões intergênicas não codificadoras ou qualquer gene para os quais a inativação ou anulação não prejudica significativamente desenvolvimento, replicação ou infecção. Uma pessoa também pode considerar inserção em um local viral essencial contanto que a função defeituosa seja fornecida *in trans* durante a produção de partículas virais, por exemplo usando-se uma linha celular auxiliar que carrega as seqüências complementares correspondente àqueles anulados no genoma poxviral.

Quando se usa o vírus vaccinia de Copenhagen, o ácido nucleico codificador de polipeptídeo de HPV-18 precoce é preferivelmente inserido no gene de timidina cinase (tk) (Hruby et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411-3415; Weir et al., 1983, J. Virol. 46, 530-537). Entretanto, outros locais de inserção também são apropriados, por exemplo, no gene de hemaglutinina (Guo et al., 1989, J. Virol. 63, 4189-4198), no local K1L, no gene u (Zhou et al., 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190) ou na extremidade esquerda do genoma do vírus vaccinia onde uma variedade de anulações espontâneas ou projetadas foram relatados na literatura (Altenburger et al., 1989, Archives Virol. 105, 15-27; Moss et al. 1981, J. Virol. 40, 387-395; Panicali et al., 1981, J. Virol. 37, 1000-1010; Perkus et al, 1989, J. Virol. 63, 3829-3836; Perkus et al, 1990, Virol. 179, 276-286; Perkus et al, 1991, Virol. 180, 406-410).

Quando se usa MVA, o ácido nucleico codificador de polipeptídeo de HPV-18 precoce pode ser inserida em qualquer uma das anulações identificadas I a VII bem como no local D4R, mas a inserção na anulação II ou III é preferida (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

Quando se usa vírus fowlpox, embora a inserção dentro do gene de timidina cinase possa ser considerada, o ácido nucleico codificador de polipeptídeo de HPV-18 precoce é preferivelmente introduzido na região intergênica situada entre ORFs 7 e 9 (ver, por exemplo, EP 314 569 e US 5,180,675).

Como descrito acima, a composição em uso na invenção ainda pode compreender um ácido nucleico que expressa citocina. Isto pode ser realizado pelo vetor que codifica o um ou mais polipeptídeos de HPV-18 precoces ou por um vetor independente que pode ser da mesma origem ou diferente.

Uma forma de realização preferida da invenção é direcionada ao uso de uma composição que compreende um vetor de MVA que codifica o polipeptídeo E6 de HPV-18 colocado sob o promotor 7,5K, o polipeptídeo de HPV-18 E7 colocado sob o promotor 7,5K e o gene IL-2 humano colocado sob o controle do promotor H5R. Preferivelmente, ácidos nucleicos que codificam o polipeptídeo E6 de HPV-18, o polipeptídeo de HPV-18 E7 e o IL-2 humanos são inseridos na anulação III do genoma de MVA.

Além disso, a composição em uso na invenção pode incluir uma ou mais substâncias estabilizantes, tais como lipídeos (por exemplo, lipídeos catiônicos, lipossomas, lipídeos como descrito em WO98/44143), inibidores de nuclease, hidrogel, hialuronidase (W098/53853), colagenase, polímeros catiônicos, polissacarídeos, agentes de quelação (EP890362), a fim de preservar sua degradação dentro do corpo animal e/ou humano e/ou melhorar a transfecção/infecção do vetor na célula hospedeira ou organismo. Tais substâncias podem ser usadas sozinhas ou em combinação (por exemplo, lipídeos catiônicos ou neutros).

As partículas virais infecciosas que compreendem o ácido nucleico descrito acima ou vetores podem ser produzidas por processo de rotina. um processo exemplar compreende as etapas de:

- (a) introduzir o vetor viral em uma linha celular adequada,
- (b) cultivar a dita linha celular sob condições adequadas a fim de permitir a produção da dita partícula viral infecciosa,
- (c) recuperar a partícula viral infecciosa produzida a partir da cultura da dita linha celular e
- (d) opcionalmente, purificar dita partícula viral infecciosa recuperada.

Quando o vetor viral é defeituoso, as partículas infecciosas são usualmente produzidas em uma linha celular de complementação ou por intermédio de um vírus auxiliar, que fornece *in trans* os genes virais não funcionais. Por exemplo, linhas celulares adequadas para complementar vetores adenovirais anulados em E1 incluem as 293 células (Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36, 59-72) bem como as células PER-C6 (Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917). as células apropriadas para a propagação de poxvírus vetores são célula aviárias e mais preferivelmente fibroblastos de embrião de galinha primários (CEF) preparados a partir de embriões de galinha obtidos a partir de ovos fertilizados.

As partículas virais infecciosas podem ser recuperadas do sobrenadante de cultura ou a partir das células após a lise (por exemplo, por meios químicos, congelamento/descongelamento, choque osmótico, choque mecânico, sonificação e outros). As partículas virais podem ser isoladas por séries consecutivas de purificação de placa e então purificadas usando-se as técnicas da técnica (métodos cromatográficos, ultracentrifugação em cloreto de cério ou gradiente de sacarose).

A presente invenção também abrange o uso de vetores ou partículas virais que foram modificadas para permitir o alveijamento preferencial a uma célula hospedeira alvo particular (ver, por exemplo, Wickam et al., 1997, J. Virol. 71, 8221-8229; Arnberg et al., 1997, Virol. 227, 239-244; Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660-668; WO94/10323;

WO02/96939 e EP 1 146 125). Um aspecto particular de vetores e partículas virais alvejadas é a presença em sua superfície de um ligando capaz de reconhecer e ligar-se a um componente de superfície celular ou exposta tal como um marcador específico celular (por exemplo, uma célula infectada por HPV), um marcador específico de tecido (por exemplo, um marcador específico cervical), bem como um antígeno viral (por exemplo, HPV). Os exemplos de ligandos adequados incluem anticorpos ou fragmentos destes direcionados a um domínio antigênico de HPV. O ligando é, usualmente, inserido geneticamente em um polipeptídeo presente na superfície do vírus (por exemplo, fibra adenoviral, penton, pIX ou produto genético p14 de vaccinia).

A composição em uso na presente invenção pode ser produzida por qualquer método adequado, por exemplo, pelas técnicas sensibilizadoras de peptídeo diretas padrão (por exemplo, Bodanszky, 1984 in Principles of peptide synthesis, Springer-Verlag) e pela tecnologia de DNA recombinante em células hospedeiras apropriadas. Por exemplo, o ácido nucleico codificando quanto aos polipeptídeos E6 e E7 de HPV-18 precoces podem ser isolados diretamente a partir de células contendo HPV, cDNA e bibliotecas genômicas, genomas virais ou qualquer vetor da técnica anterior conhecido por incluí-los, por biologia molecular convencional ou técnicas de PCR. Se necessário, este ainda pode ser modificado pelas técnicas de mutagênese de rotina. Alternativamente, o ácido nucleico em uso na invenção também pode ser gerado pela síntese química em processo automatizado (por exemplo, montado a partir de oligonucleotídeos sintéticos de sobreposição como descrito por exemplo em Edge, 1981, Nature 292, 756; Nambair et al., 1984, Science 223, 1299; Jay et al., 1984, J. Biol. Chem. 259, 6311). aqueles habilitados na técnica estão informados sobre os sistemas de expressão numerosos disponíveis para a produção do polipeptídeo de HPV-18 precoces em células hospedeiras apropriadas e dos métodos para a produção de um

vetor ou de uma partícula viral infecciosa em uma célula hospedeira.

O uso preferido de uma composição de acordo com a invenção é para o tratamento uma variedade de doenças e condições patológicas, especialmente aquelas associados com uma infecção por HPV causado por pelo menos um dos genótipos de HPV listados abaixo. Embora a invenção também abrange uma profilaxia, é especialmente útil para a terapia, por exemplo, para tratamento da infecção persistente de HPV, pré-cancerosas bem como condições cancerosas que podem desenvolver em pacientes infectados por HPV. Exemplos de condições cancerosas associadas com HPV incluem carcinoma cervical, carcinoma anal e câncer oral. As condições pré-cancerosas associados ao HPV estende-se a partir das lesões de alto grau à baixo grau incluindo neoplasia epitelial intra-cervical (CIN) de grau 1, 2 ou 3.

Preferivelmente, na administração em um organismo hospedeiro de acordo com as modalidades descritas neste, a composição da invenção fornece um benefício terapêutico ao organismo hospedeiro tratado. O benefício terapêutico pode ser evidenciado por diversas maneiras como comparadas ao tratamento anterior, por exemplo em um nível de população por uma diminuição da frequência da infecção por HPVs, por um atraso no desenvolvimento de uma condição patológica tipicamente associada com infecção por HPV (por exemplo, atraso no desenvolvimento de lesões CIN ou cânceres cervicais) ou no nível individual por uma diminuição de HPV viremia, e/ou uma inibição de expressão de gene viral (por exemplo, uma diminuição RNAs que expressam HPV E6 ou E7) e/ou por uma melhoria do resultado clínico (por exemplo, estabilização, regressão parcial ou total de uma lesão associada ao HPV) e/ou por uma estimulação do sistema imune resultante no desenvolvimento de uma resposta anti-HPV intensificada humoral ou celular ou ambos (por exemplo, produção de anticorpos de anti-HPV e/ou imunidade mediada por células T) e/ou por uma resposta melhorada do organismo hospedeiro por terapias convencionais. Por exemplo,

a composição usada de acordo com a invenção fornece um benefício quando esta administração à mulheres com HPV positivo é seguido por (i) uma detecção de HPV negativo seguinte um ou mais detecções positivas, (ii) uma regressão de lesões CIN2/3 de alto grau por CIN 1 de baixo grau ou (iii) a estabilização ou regressão de um carcinoma cervical invasivo. Um acompanhamento regular dos pacientes após o tratamento é recomendado durante um mínimo de 6 meses.

A presença de HPV pode ser determinado em fluido biológico (por exemplo, um fluido cervical ou vaginal, sanguíneo, soro, plasma), amostras ginecológicas coletadas usando dispositivo de amostragem cervical convencional, seções de tecido, e biópsias. Uma variedade de métodos são disponíveis por aqueles habilitados na técnica para avaliar a presença de DNA de HPV e RNA em uma amostra, tal como sistema LiPA (WO99/14377; Labo Biomedical products, Países Baixos), Pre Tect HPV Proofer (NorChip AS, Norway), Sistema Hybrid Capture II (Digene Corp, USA), Sistema Thin Prep (Cytoc Corporate; Marlborough, MA) e Sistemas PCRIRT-PCR. Os iniciadores adequados são conhecidos àquela pessoa habilitada ou podem ser facilmente sintetizados na base da seqüência de nucleotídeo do genótipo de HPV de interesse. Um também pode proceder pelos ensaios de imunogenicidade (por exemplo, ELISA) usando anticorpos adequados. A regressão ou estabilização de uma lesão induzida por HPV pode ser determinada pela medição do tamanho atual da lesão em um período de tempo. A observação direta (por exemplo, colposcopia), métodos de visualização radiológicos, métodos de visualização imunológicos ou ultrassom pode ser usado para avaliar o tamanho da lesão durante o período. Além disso, uma variedade de métodos in vitro pode ser usado a fim de prever estabilização ou regressão de uma lesão associada ao HPV em um organismo hospedeiro, tal como análise histológica ou citológica para avaliar a presença de células atípicas. A estimulação de uma resposta imune anti-HPV pode ser

avaliada por diversas técnicas de rotina tal como aquelas descritas abaixo em conexão com o uso de uma composição para induzir ou estimular uma resposta imune.

Adequadamente, a composição da invenção ainda compreende um veículo aceitável farmaceuticamente para fornecer uma composição farmacêutica. Como usado neste, a “veículo aceitável farmaceuticamente” é pretendido para incluir qualquer ou todos os carregadores, solventes, diluentes, excipientes, adjuvantes, dispersão média, revestimentos, agentes anti-bacterianos ou anti-fúngicos, e agentes retardantes de absorção, e outros, compatível com a administração farmacêutica. O veículo aceitável farmaceuticamente incluído em uma composição também deve permitir preservar esta estabilidade sob as condições de fabricação e armazenamento duradouro (isto é pelo menos um mês) em congelamento (por exemplo, -70°C, -20°C), refrigerado (por exemplo, 4°C) ou temperatura ambiente (por exemplo, 20°C) ou em um estado liofilizado.

A composição em uso da invenção é adequadamente tamponada a fim de ser apropriada por uso humano em um pH básico levemente ou fisiológico (por exemplo, entre cerca de pH 7 a cerca de pH 9). Tampões adequados incluem, sem limitação tampão de fosfato (por exemplo, PBS), tampão de bicarbonato e/ou tampão de Tris.

Além disso pode compreender um diluente apropriado para o uso animal ou humano. Um tal diluente é preferivelmente isotônico, hipotônico ou hipertônico fracamente e tem um força iônica relativamente baixa. Os exemplos representativos incluem água estéril, solução salina fisiológica (por exemplo, cloreto de sódio), solução de Ringers, glicose, trealose ou soluções de sacarose, solução de Hank, e outros soluções salinas balanceadas fisiologicamente aquosas (ver, por exemplo, a edição mais corrente de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins).

A composição também pode conter outros excipientes aceitáveis farmacologicamente para fornecer propriedades farmacodinâmicas ou farmacêuticas desejadas, incluindo por exemplo modificar ou manter a osmolaridade, viscosidade, claridade, cor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução da formulação, modificar ou manter a liberação ou absorção no organismo animal ou humano, promover o transporte cruzando a barreira sanguínea ou penetração em um órgão particular (por exemplo, fígado). Os excipientes adequados incluem aminoácidos.

Além disso, a composição pode ser usada em combinação com adjuvantes convencionais adequados para aplicação sistêmica ou mucosal em humanos.

A composição pode ser administrada ao organismo hospedeiro por uma variedade de modos de administração, incluindo administração localizada e tópica, sistêmica. As vias de administração adequadas incluem, sem limitação subcutânea, intradermal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, intravascular, e injeção intra-arterial. As injeções pode ser feitas com seringas e agulhas convencionais, ou qualquer outro dispositivo apropriado disponível na técnica. Alternativamente a composição pode ser administrada por intermédio da via mucosal, tal como a via oral/alimentar, nasal, intra-traqueal, intra-pulmonar, intra-vaginal ou intra-retal. A administração tópica também pode ser realizada usando meios transdérmicos (por exemplo, emplastos e outros). No contexto da invenção, as administrações subcutânea e intramuscular constituem as vias preferidas. A administração pode acontecer em uma dose simples ou uma dose repetida uma ou diversas vezes após um intervalo de tempo certo variando a partir do dia ao ano. Desejavelmente, os intervalos são uma substância de uma semana a um mês.

A dosagem apropriada pode ser adaptada como uma função de vários parâmetros, em particular o modo de administração; a composição

utilizada; a idade, saúde, e peso do organismo hospedeiro; a natureza e extensão dos sintomas; tipo de tratamento simultâneo; a frequência do tratamento; e/ou a necessidade para prevenção ou terapia. O refino adicional dos cálculos necessários para determinar a dosagem apropriada é rotineiramente feito por um médico, na luz das circunstâncias relevantes. Para orientação geral, a dosagem adequada para uma composição contendo vacina varia de cerca de 10^4 a 10^9 pfu (unidades formadoras de placas), desejavelmente de cerca de 10^5 e 10^8 pfu visto que adenovirus que compreende composição varia de cerca de 10^5 a 10^{13} iu (unidades infecciosas), desejavelmente de cerca de 10^7 e 10^{11} iu. Uma composição com base em plasmídeos de vetor pode ser administrada em doses entre 10 µg e 20 mg, vantajosamente entre 100 µg e 2 mg. Uma composição de proteína pode ser administrada em doses entre 10 ng e 20 mg, com uma preferência especial por uma dosagem de cerca de 0,1 µg a cerca de 2 mg por Kg de peso corporal.

Em uma forma de realização preferida, a composição em uso da invenção compreende o vetor MVA descrito acima e é administrada em três doses de 5×10^5 pfu a 5×10^7 pfu por via subcutânea em intervalos semanais.

Se desejado, o uso da invenção pode ser realizada em conjunção com um ou mais modalidades terapêuticas convencionais (por exemplo, radiação, quimioterapia e/ou cirurgia). Os métodos terapêuticos múltiplos fornece ao paciente com uma intervenção com base mais ampla. Em uma forma de realização, o método da invenção pode ser precedido ou preferivelmente seguido por uma excisão cirúrgica da lesão associada ao HPV (por exemplo, conisação). Em uma outra forma de realização, este pode ser precedido ou seguido pela radioterapia (por exemplo, radiação de gama). Aqueles habilitados na técnica podem rapidamente formular protocolos de terapia de radiação apropriados e parâmetros que podem ser usados (ver, por exemplo, Perez and Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation

Oncology, 2° Ed. JB Lippincott Co; usando adaptações apropriadas e modificações como serão rapidamente evidentes àqueles habilitados no campo). Ainda em outra forma de realização, o método ou uso da invenção é associada à quimioterapia com um ou mais medicamentos que são usados convencionalmente para tratamento ou prevenção de infecção por HPVs, condições patológicas associadas com HPV.

A composição também pode ser usada em combinação com outros polipeptídeos HPV, tal como um ou mais do polipeptídeo de HPV-16 precoces, desejavelmente os polipeptídeos E6 e/ou E7 HPV-16 preferivelmente modificados como descritos na técnica a não ser oncogênicos e membrana apresentada (ver WO99/03885). Uma tal composição que compreende os polipeptídeos E6 e/ou E7 de HPV-16 e HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica os polipeptídeos E6 e/ou E7 de HPV-16 e HPV-18 podem ser particularmente úteis para tratar uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus que não HPV-16 e HPV-18, tal como qualquer um de HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52 e HPV-58 além de qualquer um de HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70 e HPV-85 ou qualquer combinação destes (por exemplo, HPV-31 e HPV-45).

Em uma outra forma de realização, o uso da invenção é realizada de acordo com o auxílio principal modalidade terapêutica que compreende administração seqüencial de um ou mais composições de imprimação e um ou mais composições auxiliares. Tipicamente, as composições de imprimação e as auxiliares são veículos diferentes que compreende ou codifica pelo menos um domínio imunogênico em comum. A composição de imprimação é inicialmente administrada ao organismo hospedeiro e a composição auxiliares é subsequente administrada após um período de tempo que varia de um dia a doze meses. Além disso, as composições de imprimação e auxiliares podem ser administradas no mesmo

local ou em locais alternativos pela mesma via ou por vias diferentes de administração. Por exemplo, uma composição de imprimação com base em polipeptídeo HPV-18 precoce pode ser administrado por uma via mucosal visto que a composição auxiliar com base no vetor de ácido nucleico é preferivelmente injetado, por exemplo, injeção subcutânea para um vetor MVA, injeção intramuscular para um plasmídeo de DNA e por um vetor adenoviral.

A presente invenção também refere-se ao uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 para induzir ou estimular uma resposta imune contra pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18. A invenção também diz respeito a um método de indução ou estimulação em uma resposta imune de um mamífero contra pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18, o método compreendendo administrar ao mamífero uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18. A resposta imune é preferivelmente uma resposta imune celular direcionada a um polipeptídeo precoce HPV, com uma preferência por um CD4+, a CD8+ ou tanto CD4+ quanto CD8+ de resposta imune mediada.

A capacidade para induzir ou estimular uma resposta imune anti-HPV na administração em um organismo humano ou animal pode ser avaliado in vitro ou in vivo usando uma variedade de ensaios que são padrões na técnica. Para uma descrição geral de técnicas disponíveis para avaliar o começo e uma estimulação de uma resposta imune, ver, por exemplo, Coligan et al. (1992 e 1994, Current Protocols in Immunology; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). A medição da imunidade celular pode ser realizada por uma medição da perfis de citocina secretadas pelas células de efeitos ativados incluindo aquelas derivadas de CD4+ e CD8+ células T (por

exemplo, quantificação de IL-10 ou células que produzem IFN γ por ELISPOT), pela determinação do estado de ativação de células de efeito imunes (por exemplo, ensaios de proliferação de células T por uma absorção de timidina [^3H] clássica), submetendo-se ao ensaio quanto a linfócitos T específicos de antígeno em um paciente sensibilizado (por exemplo, lise específica de peptídeo em um ensaio de citotoxicidade), pela atividade citolítica anti-tumor mediada por linfócito determinado por exemplo, por um ensaio de liberação ^{51}Cr . A capacidade para estimular uma resposta humoral pode ser determinada pela ligação de anticorpo e/ou competição em ligação (ver, por exemplo, Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press) ou pela geração in vitro da inibição mediada pelo anticorpo específico de tumor de desenvolvimento celular (Gazit et al., 1992, Cancer Immunol. Immunother 35, 135-144). O método da invenção também ainda pode ser validado em modelos animais provocados com um agente de indução de tumor apropriado (por exemplo, HPV-18 E6 e células TC1 que expressam E7) para determinar atividade anti-tumor, refletindo uma indução ou uma estimulação de uma resposta imune anti-HPV.

A invenção foi descrita em uma maneira ilustrativa, é esta será entendida que a terminologia que foi usada é pretendida ser na natureza das palavras da descrição em vez da limitação. Obviamente, muitas modificações e variações da presente invenção são possíveis na luz das técnicas acima. É portanto a ser entendido que dentro do escopo das reivindicações anexadas, a invenção pode ser praticada em uma maneira diferente a partir do que é especialmente descrita neste.

Todas as descobertas citadas acima das Patentes, Publicações e Entrada de banco de dados são especialmente incorporadas neste por referência em sua totalidade à mesma extensão como se cada uma tal Patente individual, Publicação ou Entrada foram especificamente e indicadas individualmente a serem incorporadas por referência.

Os seguintes exemplos servem para ilustrar a presente invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Construção de polipeptídeos HPV-18 E6 e E7 que expressam o vírus

As construções descritas abaixo são realizadas de acordo com a engenharia genética geral e técnicas de clonagem moleculares detalhadas em Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY) ou de acordo com as recomendações do fabricante quando um equipamento comercial é usado. As técnicas de amplificação PCR são conhecidas às pessoas habilitadas na técnica (ver, por exemplo, PCR protocols - A guide to methods and applications, 1990, published by Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press). As construções de vírus de vacina recombinantes são realizados de acordo com a tecnologia convencional no campo dos documentos acima citados e em Mackett et al. (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) e Mackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864). O gene gpt de seleção (xantina guanina fosforibosiltransferase) de E. coli (Falkner and Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854) é usado para facilitar a seleção do vírus de vacina recombinante.

Um vírus MVA recombinante que expressa uma membrana ancorada e variantes não oncogênicas de polipeptídeos HPV-18 E6 e E7 (E6*TMF and E7*TMR) podem ser construídas como descrito em WO99/03885 e U.S. 6.884.786 (descrito por MVATG8042 que expressa a membrana ancorada e variantes não oncogênicas de polipeptídeos E6 e E7 de HPV-16). Preferivelmente, as seqüências do gene HPV-18 são ambos colocadas sob o controle do promotor p7,5K e inseridos na região de excisão III do genoma MVA. Se o constructo inclui um gene imunopotenciador, a preferência é dada ao gene IL-2 conduzido pelo promotor H5R. O constructo resultante é projetado por MVA-HPV-18.

As partículas do vírus MVA-HPV-18 podem ser produzidas em células CEF de acordo com as técnicas convencionais. Os estoques de vírus serão mantidos a -80°C até o dia da injeção. A suspensão viral será rapidamente descongelada, e diluída antes da administração em tampão adequado contendo por exemplo Tris-HCl de 10 mM de pH8, 5% de sacarose (p/v), e 50 mM de NaCl, a fim de obter uma dosagem viral de 5x10 pfu em um volume de 100µl.

EXEMPLO 2: A reatividade cruzada fornecida pelos polipeptídeos HPV-18 E6 e E7

A reatividade cruzada pode ser avaliada pelo ensaio IFN γ ELISPOT em esplenócitos obtidos de camundongos imunizados com MVATG HPV-18 como descrito abaixo.

As seqüências de aminoácido E6 e E7 a partir de genótipos diferentes de HPV são alinhados usando o programa de alinhamento múltiplo HUSAR (CLUSTAL) (<https://genius.emblnet.dk/fzheidelberg.de/menu/cgi-bin/w2h/w2h.start>).

Os peptídeos reconhecidos por células T previstas (H2^b restrito) pode ser identificado pelo uso do software BIMAS de ligação de peptídeo disponível na Internet (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind).

Os peptídeos tendo uma contagem de ligação igual ou acima aquela obtida com o peptídeo de referência descrito na técnica como sendo reconhecido por CTL específico por E7, será analisado. Aquele mostra uma ou duas diferenças no aminoácidos com respeito à seqüência de aminoácido de polipeptídeos HPV-18 E6 e E7 serão selecionados por esta análise de reatividade cruzada.

Os peptídeos selecionados podem ser sintetizado por técnicas de síntese convencionais e sua capacidade de atuar cruzada com esplenócitos obtidos de camundongos imunizados com polipeptídeos HPV-18 E6 e E7 e pode ser determinado como seguintes.

Os camundongos fêmeas saudáveis C57B1/6 SPF serão

obtidos de um fornecedor comercial e serão alojados sob condições controladas (simples, ambiente exclusivo, ar condicionado para fornecer um mínimo de 11 mudanças de ar por hora com faixas de temperatura e umidade relativa dentro de 18°C e 22°C e 40 a 70% respectivamente. A iluminação é controlada automaticamente para dar um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. O alimento e água são fornecidos *ad libitum* por todo o estudo).

Os camundongos fêmeas C57B1/6 com sete semanas de idade *Specific Pathogene Free* (livre de patógeno específico) (SPF), obtidos de um fornecedor comercial e alojados sob as condições definidas acima podem ser imunizados subcutaneamente 3 vezes ao dia 0,7 e 14 com 5×10^7 pfu de MVATGN33 ou MVATG HPV-18. As injeções subcutâneas são preferivelmente realizada cada um período em um local diferente do flanco direito dos animais. Os baços podem ser retirados no dia 24 após a última imunização. As células do baço frescas podem ser preparadas usando técnicas convencionais na técnica.

Um placa nitrocelulose de 96 reservatórios pode ser revestida com 3 µg/ml de anticorpo IFNg anti-camundongo de rato monoclonal (Clone R4-6A2; Pharmingen, Cat. Número 551216, 100 gl/reservatório) em tampão de carbonato de sódio. As placas podem ser incubadas durante a noite a 4°C ou 1 hora a 37°C. As placas podem ser lavadas três vezes com DMEM 10% de FCS e saturadas 2 horas a 37°C com 100µl de DMEM 10% de FCS/reservatório. Os esplenócitos podem ser colocados em uma concentração de 10^6 células/100 gl. O IL-2 pode ser adicionado aos reservatórios em uma concentração de 6U/500 reservatório (R&D Systems; 10 ng/ml). O *Concanavalin A* é geralmente usado como controle positivo (5 µg/ml).

Peptídeos que portam epítipo T previstos podem ser sintetizados e fornecidos em DMSO a 10 mg/ml pela armazenagem a 4°C. o peptídeo de referência HPV-18 é usado como controle positivo e um peptídeo irrelevante como controle negativo. Os peptídeos podem ser adicionados aos

reservatórios em uma concentração de 5 µg/ml em incubados 48 horas a 37°C, em 5% de CO₂.

Após a lavagem uma vez com PBS 1X e 5 vezes com PBS de 0,05% de Tween, o anti-camundongo biotilado IFN γ (clone XMG1,2, Pharmingen) pode ser adicionado a concentração de 0,3 µg/100 µl/reservatório e incubado 2 horas a temperatura ambiente sob lenta agitação. A placa pode ser lavada 5 vezes com PBS de 0,05% de Tween. O *Extravidin* AKP (Sigma, St. Louis, MO) diluído a 1/5000 em PBS de 0,05% de Tween FCS1% também pode ser adicionado aos reservatórios (100 µl/reservatório). A placa pode ser incubada 45 minutos em temperatura ambiente e então lavada 5 vezes com PBS de 0,05% de Tween. A secreção IFN γ pode ser revelada com Biorad Kit. O substrato de 100 µl (NBT+BLIP) pode ser adicionado por reservatório e a placa levada em temperatura ambiente por 0,5 hora. a placa pode ser lavada com água e colocada secar durante a noite em temperatura ambiente. Os pontos pode ser contados usando uma leitora Elispot Bioreader 4000 Pro-X (BIOSYS-Gmbh; Serlabo France).

É esperado que a cultura dos esplenócitos imunizados na presença de peptídeo de referência HPV-18 estimula a produção de IFN γ visto que a adição de peptídeos de reação não cruzada (tal como o peptídeo irrelevante) na cultura do esplenócito terão efeitos não significantes (produção de IFN γ sob um nível de base). A reatividade cruzada é demonstrada quando os não peptídeos HPV-18 são reconhecidos pelo CTL os camundongos imunizados, sugerindo que a vacinação com polipeptídeos HPV-18 E6 e/ou E7 ou vetores de expressão (por exemplo, MVATG HPV-18) também devem ser eficazes para tratamento de infecções com outros genótipos de HPV.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> TRANSGENE S.A.
 <120> Vacina de papilomavírus com base em HPV-18
 <130> TG175
 <160> 4
 <170> PatentIn versão 3.1

<210> 1
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Variante não oncogênica da sequência artificial <220> <223>
 do polipeptídeo B6 de HPV-18

<400> 1

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

Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His
 115 120 125

Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg
 130 135 140

Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
 145 150

<210> 2
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Variante não oncogênica da sequência artificial <220>
 <223> do polipeptídeo E7 de HPV-1

<400> 2

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 Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu
 20 25 30

Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg
 35 40 45

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

Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala
 65 70 75 80

Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys
 85 90 95

Ala Ser Gln Gln
 100

<210> 3
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Variante não oncogênica apresentada na membrana da
 sequência artificial <220> (223) do polipeptídeo B6 de
 HPV-18
 <400> 3

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Met Ala Arg Phe
 20 25 30

Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr Glu
 35 40 45

Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys Lys

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

<210> 4
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Variante não oncogênica apresentada na membrana da
 sequência artificial <220> <223> da proteína B7 de
 HPV-18

<400> 4

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Met His Gly Pro Lys Ala Thr
20 25 30

Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val
35 40 45

Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val
50 55 60

Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr
65 70 75 80

Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val
85 90 95

Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn
100 105 110

Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln Arg Ser Tyr
115 120 125

Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
130 135 140

Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His
145 150 155 160

Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly
165 170 175

Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg
180 185 190

Leu

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus que não HPV-18.

2. Uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para tratar uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18.

3. Uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18, caracterizado pelo fato de ser para induzir uma resposta imune contra pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um outro papilomavírus humano que não HPV-18 é selecionado dentre o grupo que consiste de HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70 e HPV-85.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais polipeptídeos de HPV-18 precoces é um polipeptídeo E6, um polipeptídeo E7 ou tanto um polipeptídeo E6 quanto um polipeptídeo E7.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que os ditos polipeptídeos E6 e/ou E7 de HPV-18 são variantes não oncogênicas.

7. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a dita variante não oncogênica do polipeptídeo E6 de HPV-18 compreende uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 1.

5 8. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a dita variante não oncogênica do polipeptídeo E7 de HPV-18 compreende uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 2.

10 9. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 8, caracterizado pelo fato de que os ditos polipeptídeos E6 e/ou E7 de HPV-18 são modificados a fim de serem ancorados à membrana celular pela incorporação de uma seqüência de ancoragem de membrana e uma seqüência secretora.

15 10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a dita seqüência de ancoragem de membrana e/ou seqüência secretora são obtidas a partir da glicoproteína da raiva, a glicoproteína do envelope do vírus HIV ou a proteína F do vírus do sarampo.

20 11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito polipeptídeo E6 de HPV-18 compreende uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 3.

25 12. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito polipeptídeo E7 de HPV-18 compreende uma seqüência de aminoácido que é homóloga ou idêntica à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 4.

13. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a dita composição adicional compreende a citocina ou um ácido nucleico que codifica uma citocina.

14. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo

fato de que a dita citocina é IL-2.

15. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o dito ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos de HPV-18 precoces é compreendido em um vetor.

5 16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o dito vetor é um vetor de vaccinia.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito vetor de vaccinia é um vetor de MVA.

10 18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o dito vetor de MVA compreende um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo E6 de HPV-18 colocado sob o promotor 7,5K, um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo E7 de HPV-18 colocado sob o promotor 7,5K e o gene IL-2 humano colocado sob o controle do promotor H5R.

15 19. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que os ditos ácidos nucleicos que codificam o dito polipeptídeo E6 de HPV-18, o dito polipeptídeo E7 de HPV-18 e o dito gene IL-2 humano são inseridos na anulação III do genoma de MVA.

20 20. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 19, caracterizado pelo fato de que a dita condição patológica é infecção persistente de HPV, uma condição pré-cancerosa ou cancerosa.

21. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a dita condição cancerosa associada com HPV é um carcinoma cervical, um carcinoma anal ou um câncer oral.

25 22. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a dita condição pré-cancerosa associada com HPV é uma neoplasia infra-epitelial cervical neoplasia (CIN) de grau 1, 2 ou 3.

23. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 22, caracterizado pelo fato de que a dita composição é administrada pela via subcutânea ou intramuscular.

24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 20 a 23, caracterizado pelo fato de que a dita composição é administrada em doses que compreendem de 5×10^5 pfu a 5×10^7 pfu de vetor de vaccinia.

5 25. Uso de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita composição compreende um vetor de MVA como definido na reivindicação 17, 18 ou 19 e é administrado em três doses de 5×10^5 pfu a 5×10^7 pfu por via subcutânea em intervalos semanais.

RESUMO

“USO DE UMA COMPOSIÇÃO”

A presente invenção diz respeito ao uso de uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos precoces de papilomavírus humano (HPV)-18 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais polipeptídeos precoces de HPV-18 para a fabricação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma infecção ou uma condição patológica causada por pelo menos um outro papilomavírus que não HPV-18. A invenção é de interesse muito especial na imunoterapia, em particular na prevenção ou tratamento de infecções persistentes de HPV que levam possivelmente a neoplasia intraepitelial cervical (CIN) e ultimamente ao câncer cervical.