

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 408**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2008 PCT/CU2008/000006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09021468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2008 E 08784156 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2186526**

54 Título: **Péptidos de penetración a células y su uso fusionados a biomoléculas con acción terapéutica**

30 Prioridad:

31.07.2007 CU 20070180

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

27.04.2017

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (100.0%)
AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190 CUBANACÁN
PLAYA
CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU**

72 Inventor/es:

**TORRENS MADRAZO, ISIS, DEL CARMEN;
GUERRA VALLESPI, MARIBEL;
GRANADILLO RODRIGUEZ, MILAID;
REYES ACOSTA, OSVALDO y
ACEVEDO CASTRO, BORIS ERNESTO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 610 408 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

Péptidos de penetración a células y su uso fusionados a biomoléculas con acción terapéutica

Campo técnico

5 La presente invención está dirigida a los campos de inmunología, biología celular y cáncer. Específicamente, los métodos y composiciones de la presente invención incluyen la fusión de biomoléculas de origen diferente con péptidos de penetración en células (PPC) para inducir una potente acción terapéutica.

Estado de la técnica anterior

10 Durante la última década se ha mostrado que varias proteínas tales como HIV-1 Tat, homeoproteína de Drosophila Antennapedia, y HSV-1 VP22 atraviesan la membrana celular mediante un proceso llamado transducción de proteína y alcanzan el núcleo reteniendo su actividad biológica (Prochiantz, A. (2000) Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 400-406). Ciertamente, se descubrió que los péptidos cortos derivados de dominios de transducción de proteína (péptidos de penetración a células o PPC) pueden internarse en la mayoría de tipos de células. Estos PPC han sido utilizados exitosamente para la entrega intracelular de biomoléculas (Schwarze, S.R. et al. (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?. *Trends Cell Biol.* 10:290-295). Una gama amplia de biomoléculas, tales como péptidos antigénicos, ácidos nucleicos de péptido, oligonucleótidos, proteínas de longitud completa, nanopartículas y liposomas han sido entregados de esta manera. La mayoría de los medicamentos se absorben mal en las células y esto se considera una limitación importante en su desarrollo como agentes terapéuticos. De esta manera, la fusión de agentes terapéuticos a PPC puede volverse una estrategia de elección para mejorar sus propiedades farmacológicas.

20 Varios PPC han sido identificados a partir de proteínas que incluyen la proteína Tat de virus de inmunodeficiencia humana (Frankel, A. D., and Pabo, C. O. (1988) Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193), la proteína VP22 del virus de herpes simple (Elliott, G., and O'Hare, P. (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88:223-233), y el factor de crecimiento de fibroblastos (Rojas M, et al. (1998) Genetic engineering of protein with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol.* 16:370-375). El péptido Tat ha sido utilizado para transducir proteínas a las células, tanto in vitro, como in vivo (Lindgren, M et al. (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:99-103). El uso de estos PPC en la entrega de antígenos tumorales dentro de las células puede prolongar la presentación eficiente de péptido a células T, lo cual conduce a la generación de una respuesta inmune potente contra el cáncer.

Alrededor de uno por ciento de mujeres en todo el mundo se ven afectadas por el cáncer cervical.

30 De acuerdo con la Organización Mundial de Salud, los cánceres de la cervix han hecho padecer a 500,000 mujeres o más alrededor del mundo cada año y particularmente en los países menos desarrollados el cáncer de cervix es la principal causa de muerte en mujeres.

35 Los VPH son reconocidos ahora como la causa principal de cáncer cervical. Los estudios también sugieren que los VPH pueden desempeñar un papel en cánceres de ano, vulva, vagina y algunos cánceres de la orofaringe (la parte media de la garganta que incluye el paladar blando, la base de la lengua y las amígdalas) (división de STD Prevention.

Prevention of genital HPV infection and sequelae: Report of an external consultants' meeting. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1999).

40 Los VPH son un grupo de más de 100 virus. Habitualmente, más de 30 tipos son transmitidos sexualmente. Algunos tipos de VPH son denominados como virus de "bajo riesgo" porque raramente desarrollan cáncer. Los tipos de VPH que tienen más probabilidades de conducir al desarrollo de cáncer son denominados de "alto riesgo". Tanto los tipos de VPH de alto riesgo como de bajo riesgo pueden causar el crecimiento de células anormales, pero en términos generales solamente los tipos de VPH de alto riesgo pueden conducir al cáncer. Los VPH de alto riesgo, transmitido sexualmente, incluyendo los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, y posiblemente algunos otros. Estos tipos de VPH de alto riesgo causan crecimientos que usualmente son planos y casi invisibles.

45 Las verrugas genitales (técnicamente conocidas como condilomas acuminados) están asociadas comúnmente con dos tipos de VPH de bajo riesgo, VPH-6 y VPH-11.

50 Los virus de papiloma son virus de ADN pequeño (50-60 nm) sin envoltura, que tienen un genoma de ADN bicatenario, circular de 7800 a 7900 pares de bases. El genoma contiene tres regiones principales, una que codifica genes tardíos, una que codifica genes tempranos y una región que no codifica (Park T. W. et al. (1995) Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 76:1902-1913). La región de genes tardíos tiene dos marcos de lectura abiertos separados que codifican proteínas de la cápsida del virus L1 (mayoritaria) y L2 (minoritaria). La región de genes tempranos incluye seis marcos de lectura abiertos, designados como E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Las proteínas E6 y E7

son oncoproteínas críticas para la replicación viral, así como para la inmortalización de la célula hospedera y su transformación.

5 Los métodos usados comúnmente para tratar las lesiones incluyen criocirugía (congelamiento que destruye el tejido), LEEP (procedimiento de extirpación electro-quirúrgica con un aro, remoción de tejido utilizando un aro de alambre caliente) y cirugía convencional. Pueden usarse tratamientos similares para verrugas genitales externas. Además, pueden usarse algunos medicamentos para tratar verrugas genitales externas (Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report 2002; 51(RR-6):1-78).

10 Recientemente, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos aprobó una vacuna profiláctica para prevenir las infecciones con los tipos 16 y 18, dos VPH de "alto riesgo" que causan la mayoría (70%) de los cánceres cervicales, y los tipos 6 y 11, que causan la mayoría (90%) de verrugas genitales (Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. New England Journal of Medicine 2002; 347(21): 1645-1651).

15 Han sido propuestas varias vacunas terapéuticas para el tratamiento de lesiones asociadas con el VPH. Por ejemplo, la patente US 6,306,397 (CSL Limited) describe variantes de E6/E7 del VPH para generar una respuesta inmune celular; el documento WO 93/20844 (Cancer Research Campaign Technology) habla acerca del uso de una vacuna contra el VPH con base en la proteína E7. Las patentes WO 92/10513 (The University of Queensland); US 5,547,846 (Behringwerke Aktiengesellschaft) y US 6,013,258 (Zyco Inc.) describen péptidos que componen el componente antigénico de la vacuna contra el VPH. La patente US 6,524,825 (Stressgen Biotechnologies) propone el uso de la fusión de E7 con la proteínas de choque térmico (Hsp) como vacuna para la terapia de lesiones producidas por VPH.

20 Los resultados de los ensayos clínicos con estas vacunas, así como los resultados de otras vacunas terapéuticas que usan diferentes antígenos tumorales han tenido hasta el momento sólo un éxito limitado (Dallal R.M. and Lotze M.T. (2000) The dendritic cell and human cancer vaccines Curr Opin Immunol 12:583-588), debido a que tienden a provocar respuestas de célula T auto-reactivas débiles. De esta manera, el reto principal en las vacunas de cáncer es cómo romper la auto-tolerancia y generar fuerte inmunidad antitumoral de larga duración por medio de la manipulación tanto del antígeno, como del sistema de entrega.

25 La presente invención, en contraste con el estado de la técnica anterior, propone el uso de una nueva familia de PPC y de las composiciones que comprenden antígenos de VPH, que están genéticamente fusionados con esta nueva familia de PPC, lo cual mejora la respuesta celular inmune contra antígenos de los VPH y contra células que exhiben antígenos de proteína de VPH, incluidos tumores asociados al VPH.

Explicación de la invención

35 Esta invención resuelve el problema antes mencionado y proporciona una nueva familia de PPC que puede usarse como una plataforma para fusionar biomoléculas y lograr una internalización efectiva de medicamentos en células. La nueva familia de PPC se compone del péptido que corresponde a la región 32-51 de la proteína LALF (SEQ ID N0. 1) y el péptido análogo de éste con sustituciones puntuales de aminoácidos en diferentes posiciones para el aminoácido alanina: L-2 (SEQ ID N0. 2, sustitución en la posición 2), L-8 (SEQ ID N0. 3, sustitución en la posesión 8), L-12 (SEQ ID N0. 4, sustitución en la posesión 12) y L-20 (SEQ ID N0. 5, sustitución en la posesión 20).

40 En una forma de realización particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene antígenos de VPH genéticamente fusionados con la familia de PPC tal como se mencionó previamente, lo cual mejora la respuesta inmune contra antígenos de VPH, donde las proteínas de antígeno de VPH se fusionan de modo covalente con la familia de PPC. Esta fusión genética garantiza la entrega y la distribución de antígeno de VPH a células, lo cual asegura el procesamiento de la proteína cargo y la presentación a las células T de epítopes antigénicos por largo tiempo, lo cual da lugar a una respuesta inmune celular y lo cual es un antitumoral potente.

45 La respuesta inmune puede ser una respuesta celular, en particular una respuesta citolítica, mediada por células, contra un antígeno proteico de VPH. Las composiciones pueden usarse de modo terapéutico. En la aplicación terapéutica, la inducción de una respuesta inmune en un sujeto se refiere a la generación de respuestas que exceden, ya sea en magnitud o en calidad, respuestas previamente provocadas por contacto con antígenos proteicos de VPH, exhibidas bien sea por el virus o bien por células infectadas o transformadas del sujeto.

50 En formas particulares de realización, las composiciones farmacéuticas se usan para generar respuestas inmunes a células tumorales que expresan y exhiben un antígeno proteico de VPH. En estas formas de realización, los antígenos proteicos preferidos de VPH que son dianas para las composiciones son las proteínas virales tempranas E6 y E7 que se conocen por expresarse consistentemente en tumores asociados con el VPH.

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas comprenden un antígeno proteico E6 o E7 de VPH fusionado con el PPC LALF a nivel del nucleótido, lo que permite la expresión y la purificación de una proteína que

contiene secuencias tanto de los antígenos E6/E7 como de PCC LALF. La proteína de fusión puede mezclarse con adyuvantes.

5 Las composiciones también pueden usarse de manera terapéutica en un sujeto infectado previamente con un VPH para prevenir una proliferación viral adicional o para eliminar células del sujeto que proliferan como una consecuencia de la infección con VPH, incluidos tumores que expresan y exhiben un antígeno de VPH o presentan una porción del antígeno.

10 Cuando en la presente se haga referencia a un antígeno proteico de VPH como una diana de una respuesta inmune inducida por una composición farmacéutica de la presente invención, se entiende que el antígeno proteico de VPH incluye una proteína entera VPH o una porción de polipéptido de la proteína de VPH exhibida sobre la superficie de VPH o en una célula infectada de un sujeto como también en un péptido mostrado por una célula infectada como resultado de procesar y presentar la proteína de VPH, por ejemplo mediante las vías típicas MHC, clase I o II.

15 Las secuencias genómicas de muchos tipos diferentes de VPH fueron clonadas y caracterizadas mediante análisis de secuencia de ADN. Se encuentran disponibles vectores bacterianos que contienen genoma de VPH completos o parciales a partir de diversas fuentes que incluyen, por ejemplo, la American Tissue Culture Collection (ATCC). Pueden aislarse y determinarse tipos adicionales de VPH útiles para la práctica de la presente invención mediante los métodos previamente establecidos para este propósito; tales métodos son bien conocidos en la técnica.

20 En la aplicación de la presente invención es de particular importancia para el tratamiento terapéutico de cánceres asociados con VPH la observación de que las proteínas E6 y E7 de VPH se expresan de modo consistente en cánceres cervicales ((Zur Hausen H. (1987) Papillomaviruses in human cancer. Appl Pathol 5:19-24; Pater M.M., Pater A. (1985) Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. Virology 145:313-318).

25 Finalmente, los estudios en modelos animales demuestran que la inmunización con una proteína E7 protege ratones contra un reto con células de pulmones transformadas con un gen activado c-Ha-ras y los genes E6/E7 de VPH (Lin K.Y. et al. (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. Cancer Res. 56:21-26). Desde el punto de vista de que estas proteínas se expresan típicamente en cánceres que aparecen como una consecuencia de una infección con VPH, que las mismas proteínas también son los oncogenes que muy probablemente desempeñan un papel principal en el desarrollo y mantenimiento de los cánceres y que puede dirigirse una respuesta inmune contra estas proteínas; E6 y E7 son dianas preferidas para intervención inmune o profilaxis y, por lo tanto, son antígenos proteicos preferidos de VPH de las composiciones farmacéuticas de la presente invención que van a usarse para prevenir o tratar cánceres asociados con VPH.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden usarse para mejorar una respuesta inmune, particularmente una respuesta citolítica mediada por células contra un VPH, o una célula excitada o transformada por VPH que expresa un antígeno de VPH. Estas composiciones pueden administrarse a un sujeto por una variedad de vías. Las rutas de administración incluyen rutas intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural e intranasal.

35 Puede usarse cualquier otra ruta conveniente de administración, por ejemplo infusión o inyección de bolo, o absorción a través del epitelio o del revestimiento mucocutáneo. Adicionalmente, las composiciones descritas en la presente pueden contener y administrarse con adyuvantes. Además, las composiciones pueden usarse ex vivo como un medio para estimular células sanguíneas blancas obtenidas de un sujeto para provocar, expandir y propagar in vitro células inmunes específicas del antígeno proteico de VPH que a continuación se reintroducen en el sujeto.

40 La cantidad efectiva es una cantidad tal que cuando se administra induce una respuesta inmune contra el antígeno proteico de VPH el cual la codifica. Adicionalmente, la cantidad de composiciones farmacéuticas administradas al sujeto pueden variar dependiendo de una variedad de factores que incluyen el antígeno proteico, o los antígenos, de VPH, el tamaño, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, así como también su capacidad de respuesta inmunológica en general.

45 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Imagen por microscopía de fluorescencia que muestra la capacidad de penetración de PPC LALF en las células

1- LALF en J774 at 37°C durante 10 min

2- LALF en J774 at 37°C durante 20 min

50 3- LALF en J774 at 37°C durante 30 min

4- LALF en J774 at 4°C durante 10 min

- 5- LALF en J774 at 4°C durante 20 min
- 6- LALF en J774 at 4°C durante 30 min
- 7- LALF en CaSki at 37°C durante 30 min
- 8- LALF en CaSki at 37°C durante 1 h
- 5 9- LALF en CaSki at 37°C durante 2 h
- 10- LALF en HeLa at 37°C durante 30 min
- 11- LALF en HeLa at 37°C durante 1 h
- 12- LALF en HeLa at 37°C durante 2 h
- 13- LALF en TC-1 at 37°C durante 30 min
- 10 14- LALF en TC-1 at 37°C durante 1 h
- 15- LALF en TC-1 at 37°C durante 2 h
- 16- L-2 en Hep-2 at 37°C durante 30 min
- 17- L-2 en Hep-2 at 37°C durante 1 h
- 18- L-2 en Hep-2 at 37°C durante 2 h
- 15 19- L-20 en Hep-2 at 37°C durante 30 min
- 20- L-20 en Hep-2 at 37°C durante 1 h
- 21- L-20 en Hep-2 at 37°C durante 2 h
- 22- Células J774 (control negativo)
- 23- Péptido no relacionado en J774 a 37°C durante 2 h
- 20 Figura 2. Imagen por microscopía de fluorescencia que muestra la capacidad de penetración de L-2 y L-20 en células
1a y 1b. Células no tratadas (control negativo)
2a y 2b. Células tratadas durante 10 min con péptido L-2
3a y 3b. Células tratadas durante 10 min con péptido L-20
4a y 4b. Células tratadas durante 30 min con péptido L-2
25 5a y 5b. Células tratadas durante 30 min con péptido L-20
6a y 6b. Células tratadas durante 1 h con péptido L-2
7a y 7b. Células tratadas durante 1 h con péptido L-20
8a y 8b. Células tratadas durante 18 h con péptido L-2
9a y 9b. Células tratadas durante 18 h con péptido L-20
- 30 Figura 3. Representación esquemática del constructo pPEPE7M-7
Figura 4. Imagen por microscopía de fluorescencia que muestra la capacidad de penetración de LALF-E7 en células
1- LALF-E7 en J774 at 37°C durante 30 min
2- LALF-E7 en J774 at 37°C durante 1 h

3- LALF-E7 en J774 at 37°C durante 2 h

4- E7 en J774 a 37°C durante 2 h

5- PBS en J774 a 37°C durante 2 h

6- CasKi

5 Figura 5. Western blot que muestra la internalización de LALF-E7 en las células

1- J774

2- J774 + E7

3- J774 + LALF-E7

4- LALF-E7

10 Figura 6. Imagen por microscopia de fluorescencia que muestra la capacidad de penetración de LALF-GFP en las células

1- LALF-GFP

2- LALF biotina

3- GFP

15 4- PBS

Figura 7. Gráfico que muestra el efecto del tratamiento con LALF-E7 en tumores sobre el volumen tumoral establecido de células TC-1 en ratones

Figura 8. Gráfico que muestra que el efecto del tratamiento con LALF-E7 en tumores sobre el volumen tumoral establecido de células TC-1 en ratones depende de la fusión covalente de la proteína.

20 Figura 9. Gráfico que muestra el conteo de células efectoras formadas de puntos (SFC) por 10⁶ de un conjunto de esplenocitos de 3 ratones inmunizados con preparaciones diferentes.

Ejemplos.

Ejemplo 1. Internalización de PCC LALF o sus análogos a las células con diferentes orígenes histológicos

25 Fueron usadas diferentes líneas celulares en esta realización (Tabla 1). Las células fueron cultivadas sobre cubre objetos estériles de vidrio de 22 mm durante toda una noche a 37 °C y 5% de CO₂ con RPMI 1640, 10% de suero bovino fetal inactivado y 2 mM de glutamina. Luego fueron adicionados 25 o 50 mM de PPC LALF o sus análogos biotinilados L-2 y L-20 e incubados a 37 °C y 4 °C en tiempos diferentes (10 min, 20 min, 30 min, 1 h y 2 h).

30 Las células se lavaron brevemente con PBS y se fijaron por medio de 4% de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS. La permeabilización de las células fue con 0.5% de Tritón X-100 por 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS. Las células se incubaron por 1 hora en SFB de bloqueo al 1% en PBS a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS. Se incubó con 1:50000 estreptavidina-fluoresceína en PBS por 45 minutos en una cámara oscura. Se lavó de manera extensa con PBS. Se montaron los cubre objetos sobre portaobjetos con medio de montaje acuoso. Se examinó usando un microscopio de fluorescencia con los filtros apropiados.

35 Tabla 1 Internalización del PPC LALF o sus análogos a células de diferente origen histológico

Células	Péptido CPP (µM)	Temperatura (°C)	Tiempo
J774	25 µM LALF 50 µM LALF	37°C, 4°C	10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2h,
CasKi	50 µM LALF	37°C	30 min, 1 h, 2h
HeLa	50 µM LALF	37°C	30 min, 1 h, 2h
TC-1	50 µM LALF	37°C	30 min, 1 h, 2h
Hep2	50 µM LALF 50 µM L-2 50 µM L-20	37°C	30 min, 1 h, 2h

Como control negativo se utilizaron biotinilados no relacionados y células sin péptido

Los resultados mostraron (figura 1) que el PPC LALF y sus análogos se internalizaron en diferentes tipos de células y tiempos breves de incubación (30 min).

- 5 Adicionalmente, PPC LALF fue internalizado en las células J774 con solamente 10 min de incubación a 4°C, lo que confirma las características de estos péptidos como PPC, cualquier ruta utilizada para internalización es independiente de endocitosis.

Estos resultados son similares cuando se utilizan los análogos L-8 y L-12.

Ejemplo 2. Internalización de los análogos L-2 y L-20 a esplenocitos de murino

- 10 Para el aislamiento de esplenocitos se sacrificaron los ratones C57BL/6 mediante dislocación de la cervical y se retiraron de modo aséptico los esplenocitos. Las suspensiones celulares de los animales por cada grupo se combinaron y luego se homogeneizaron de manera fluida. Los esplenocitos se lavaron y los eritrocitos se lisaron con una solución de NH₄Cl al 0.83%. Después de lavar se dividieron los esplenocitos en diferentes tubos con 20x10⁶ de células en 10 mL del medio fresco de RPMI 1640 suplementado con 7% de suero bovino fetal. Cada preparación fue incubada con 0.8 mg
- 15 de los péptidos biotinilados L-2 (278 mM) y L-20 (280 mM) en tiempos diferentes: 10 min, 30 min, 1 h y 18 h. Las incubaciones fueron a 37°C y 5% de CO₂. Las células se montaron en porta-objetos estériles de vidrio, se fijaron, se permeabilizaron y se trataron con yoduro de propidio para teñir el núcleo y con estreptavidina-fluoresceína para detección de péptidos dentro de las células. Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal (Figura 2) mostraron que los péptidos L-2 y L-20 se internalizaron a cortos tiempos de incubación (30 min).

- 20 Estos resultados son similares cuando se usan el PPC LALF y los análogos L-8 y L-12.

Ejemplo 3. Clonación y expresión de proteína de fusión recombinante PPC LALF o análogos con E7

- La síntesis química de las dos cadenas de ADN a partir de PPC LALF fue realizada con el fin de obtener la fusión recombinante PPC LALF con proteína E7. El fragmento de ADN PPC LALF (SEQ ID N0. 6) con sede en en los extremos 5' y 3' los sitios de restricción abiertos NcoI y HindIII, respectivamente. La E7 de secuencia de ADN de VPH 16 contiene
- 25 en los extremos 5' y 3' los sitios de restricción abiertos HindIII y BamHI, respectivamente. También contienen en el triplete que codifica la primera cisteína de E7 una sustitución de T por G, a fin de eliminar el sitio de reconocimiento pf E7 a la proteína Rb (SEQ ID N0. 7). Ambos fragmentos sintéticos fueron insertados con los usos de T4 ligasa en el vector pM238 (Yero D. et al (2006) Bicistronic expression plasmid for the rapid production of recombinant fused proteins in Escherichia coli. Biotechnol Appl Biochem. 44:27-34) previamente digerido con NcoI y BamHI. Este vector contiene el promotor triptófano de E. coli y la señal de terminación del bacteriófago T₄ (terminador T4) que permite ser utilizado para la expresión de proteína en E. coli. Además contiene una secuencia de 6 y piridinas en el extremo 3' que permite una purificación de proteína mediante cromatografía de metales de afinidad.
- 30

- La reacción de ligazón fue transformada en una preparación de células competentes de E. coli. Las células transformadas obtenidas fueron examinadas mediante análisis con 5 enzimas de restricción. Además, los clones
- 35 positivos fueron examinados mediante secuencia de cadena doble utilizando para esto un cebador con sentido de 27 bases (SEQ ID N0. 8) que hibrida con la E7, y fue corroborada la correcta fusión de proteína (SEQ ID N0. 9 y 10) y la sustitución de cisteína por glicina en el sitio de unión con la proteína Rb. El clon (figura 3) fue denominado pPEPE7M-7.

Estos resultados son similares cuando en lugar de PPC LALF se usó cualquiera de sus análogos L-8 y L-12.

Ejemplo 4. Fermentación y purificación de proteína de fusión recombinante PPC LALF o análogos con E7

- 40 El plásmido pPEPE7M-7 fue transformado en la cepa BL- 21 de E. coli. Los clones de transformación fueron sometidos a procedimientos de fermentación en el medio mínimo que contenía M9 SALT y suplementado con CaCl₂ de 0.1M, MgCl₂ de 0.1 M, 1% de glucosa, 1% de caseína hidrolizada, 0,5% de triptona y 100 µg/mL de ampicilina durante 24 horas a 37°C con agitación de 250 rpm. Después de 9 horas de fermentación con una densidad óptica de aproximadamente 1 a 620 nm, se adicionaron 40 µg /mL de ácido indolacrílico para inducir la expresión de proteína
- 45 recombinante. Esta inducción se mantuvo durante 15 horas. La sedimentación de las células fue hecha mediante una centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Se suspendieron 5 g de biomasa en 25 ml de una solución reguladora de pH de 50 mM de NaH₂PO₄; 0.3 M NaCl; pH 8, y se sometieron a una ruptura celular por ultrasonido (0.5 ciclos, 70 de amplitud por 1 minuto). El procedimiento de ruptura se hizo 5 veces. Las células rotas se homogeneizaron y centrifugaron a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C.

- 50 El sobrenadante de esta centrifugación fue eliminado y la fracción insoluble que contenía la proteína recombinante fue recogida para su purificación.

Se lavaron 3 g de precipitado con 30 mL de la solución reguladora 50 mM de Tris-HCl; 3 mM de EDTA; 0.8 M de NaCl; 0.01 M de MgCl₂; 0.1 % de NP40 y se hizo la homogeneización en un Polytron a una velocidad de rotación de 9500 × 1 minuto. El homogeneizado fue centrifugado a 10 000 rpm por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado de la centrifugación y la fracción insoluble fue suspendida en los 30 mL de la solución reguladora 50 mM de NaH₂PO₄; 0,3 M de NaCl; pH 8 y la homogeneización se realizó tal como se describió previamente. El homogeneizado fue centrifugado a 10 000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Con el fin de hacer la extracción de la proteína de la fracción insoluble se suspendió 1 g de la proteína en 100 ml de urea de 4 M en la solución reguladora 50 mM de NaH₂PO₄; 0.3 M de NaCl, pH 8. La homogeneización fue hecha con un Polytron a una velocidad de rotación de 9.500 por 1 minuto. Después de que la extracción fue centrifugada a 10 000 rpm por 20 minutos a 4°C. La fracción soluble fue separada de la extracción que contenía la proteína de interés. Esta fracción fue aplicada a una columna de Ni-NTA (His-Select™ Nickel Affinity Gel, Sigma) equilibrada con 4 M en solución reguladora 50 mM de NaH₂PO₄; 0.3 M de NaCl; pH 8 y 5 mM de imidazol. La columna fue lavada con el mismo regulador de equilibrio y 40 mM de imidazol y se realizó la elución de proteína con 250 mM de imidazol. La proteína purificada se sometió a diálisis con el regulador de pH Tris 1x pH 8.4 utilizando una membrana de 10 µm de diámetro. Finalmente la proteína fue esterilizada mediante filtración a través de un filtro de 0.22 µm.

Estos resultados son similares cuando en lugar de PPC LALF se utilizó cualquiera de sus análogos L-2, L-8, L-12 y L-20.

Ejemplo 5. Demostración mediante microscopía de fluorescencia de que PPC LALF o sus análogos internalizan la proteína cargo E7 en la célula

Las células J774 se cultivaron sobre cubre objetos estériles de vidrio de 22 mm por una noche a 37° C y 5% de CO₂ con RPMI 1640, 10% de suero fetal bovino inactivado y 2 mM de glutamina. Luego fueron incubados diferentes cubre objetos de vidrio con 1.66 µM de proteína de fusión LALF-E7, 1.66 µM de proteína E7 y PBS (como control negativo) a 37°C por 30 min, 1 hora y 2 horas. Las células CasKi (células humanas que expresan VPH 16) se cultivaron como control positivo en las mismas condiciones experimentales.

Después de la incubación se lavaron las células brevemente con PBS y se fijaron mediante 4% de paraformaldehído por 20 min temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS. Se realizó la permeabilización de las células con 0.5% de Tritón X-100 por 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS. Después las células se incubaron por 1 hora en SBF de bloqueo de 1% en PBS a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS. Las células fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti E7/VPH 16 de IgG de cabra (Santa Cruz) diluido en PBS 1:50. Se lavó extensivamente con PBS. Se incubó con anticuerpo policlonal IgG anti-cabra-fluoresceína (Santa Cruz) diluido en PBS 1:50 por 45 minutos en una cámara oscura. Se lavó extensivamente con PBS. Se montaron cubre objetos con medio de montaje acuoso. Se examinó utilizando microscopio de fluorescencia con filtros apropiados.

Los resultados mostraron (Figura 4) células fluorescentes sólo en el caso de incubación de las células J774 con la fusión LALF-E7 y en las células CasKi. Se obtuvieron resultados negativos con la incubación de J774 con E7 y PBS. Estos resultados muestran que la proteína E7 alcanza su internalización dentro de la célula sólo en el caso cuando se fusiona con LALF.

Estos resultados son similares cuando en lugar de PPC LALF fue utilizado cualquiera de sus análogos L-2, L-8, L-12 y L-20.

Ejemplo 6. Demostración por medio de Western blot de que el PPC LALF o sus análogos internalizan la proteína cargo en la célula

Las células J774 fueron cultivadas por toda una noche a 37° C y 5% de CO₂ con RPMI 1640, 10% de suero fetal bovino inactivado y 2 mM de glutamina. Después las células se separaron en alícuotas en tubos con 5x10⁶ células cada uno y se incubaron con 25 µM de proteína de fusión LALF-E7, 25 µM de proteína E7 y PBS durante 4 horas a 37°C. La sedimentación de las células se hizo por medio de una centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. La pella se lavó tres veces con PBS. Las células se rompieron en 100 µl de regulador RIPA (Promega) se mezclaron en vórtex durante 10 segundos y 2 minutos en hielo. La sedimentación de las células rotas se hizo mediante centrifugación a 12000 rpm durante 15 minutos. Se determinó la concentración de proteína para separar el extracto celular y se aplicaron 10 µg de proteína total en un gel de poliacrilamida al 15%. A continuación, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de cabra IgG anti-E7 VPH 16 (Santa Cruz) diluido en PBS (1:100). Se realizaron tres lavados con PBS. A continuación la membrana fue incubada por 45 minutos a temperatura ambiente y y en una cámara oscura con un conjugado de peroxidasa anti-cabra IgG (Sigma) diluida en PBS (1:5000). Se realizaron tres lavados con PBS. Finalmente se utilizó el sistema ECL de Amersham Pharmacia Biotech. Tal como se muestra en la figura 5 pudieron extraerse cantidades suficientes de la proteína de fusión (LALF-E7) dentro de las células J774 después de un tiempo breve de incubación in vitro de las células con la proteína, la cual fue reconocida por el anticuerpo anti-E7. Sin embargo no fue detectado ningún reconocimiento en el carril donde se aplicó el extracto de las células incubadas con la proteína E7 y PBS.

Estos resultados son similares cuando en lugar del PPC LALF se utilizó cualquiera de sus análogos L-2, L-8, L-12 y L-20.

Ejemplo 7. Demostración por microscopía de fluorescencia que el PPC LALF o sus análogos internalizan la proteína cargo GFP en las células

- 5 La proteína producida en *E. coli* a partir de la fusión recombinante LALF-GFP (GFP- del inglés green fluorescence protein) fue utilizada para verificar que el PPC LALF o sus análogos podían internalizar la proteína cargo. La GFP (GenBank Accession # U55762) fue obtenida utilizando la reacción en cadena de la polimerasa a partir del plásmido pEGFP-N1 de Clontech utilizando oligonucleótidos con SEQ ID N.º 11 y 12. Ambos oligonucleótidos tienen sitios de restricción utilizados para clonación (HindIII- con sentido y BamHI- con el antisentido).
- 10 Para la construcción del fragmento recombinante, LALF sintético y el gen de GFP obtenido mediante PCR fueron insertados con la ligasa T4 en el vector pM238, de manera similar que en el ejemplo III. El clon recombinante se identifica con las SEQ ID N.º 13 y 14.

Con la proteína LALF-GFP recombinante y purificada se realizó un experimento similar al del ejemplo V, pero en este caso las células J774 fueron incubadas con LALF-GFP, LALF biotinilado, GFP y PBS.

- 15 Los resultados obtenidos (Figura 6) mostraron células fluorescentes cuando las células J774 fueron incubadas con la fusión LALF-GFP, similares a aquellas obtenidas mediante LALF-biotinilado. No se observaron células fluorescentes con la incubación de J774 con GFP y PBS.

Estos resultados muestran que la proteína cargo, en este caso la GFP, alcanza su internalización hacia la célula solamente cuando se fusiona al LALF.

- 20 Estos resultados son similares cuando en lugar del PPC LALF se utilizó cualquiera de sus análogos L-2, L-8, L-12 y L-20.

Ejemplo 8. Tratamiento de tumores establecidos en ratones con la fusión de proteínas de PPC LALF o sus análogos con E7 (LALF+E7)

- 25 A fin de observar la regresión de tumores establecidos a partir del tratamiento con la fusión proteica LALF-E7 recombinante, se utilizó la línea celular tumoral TC-1.

La línea celular tumoral TC-1 que expresa la proteína E7 de VPH16 E7 fue derivada de células primarias de pulmón de ratones C57Bl/6 a través de la inmortalización y transformación de las células con los genes VPH16 E6 y E7 y un gen humano activado C-Ha-ras tal como se describió en Lin et al. (1996)) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. Cancer Res. 56:21-26. Para la inoculación de los tumores, las células TC-1, suministradas por el Dr. T.-C. Wu (The Johns Hopkins Medical institutions, Baltimore, Md.), fueron cultivadas hasta 60-70% de confluencia en medio RPMI1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (Hyclone, Logan, Utah), aminoácidos no esenciales, glutamina, piruvato, gentamicina, beta-mercaptoetanol y 0.4 mg/mL de Geneticin a 37°C. Las células se cosecharon mediante tripsinización y se re-suspendieron en una solución reguladora de Hank a 2.5×10^5 células/mL.

- 30 Se inocularon ratones C57BL/6 con 2×10^5 células mediante inyección subcutánea en la pata derecha en volúmenes de 0.2 mL. A los 10 días cuando todos los animales habían desarrollado tumores palpables, los animales fueron asignados arbitrariamente a cuatro grupos de tratamiento. Cada grupo incluía 10 animales. Se realizaron dos inmunizaciones, cada 14 días. El grupo 1 fue inmunizado con la proteína recombinante LALF-E7; el grupo 2 con la proteína E7 recombinante; el grupo 3 con el péptido sintético LALF y el grupo 4 con PBS. La cinética humoral en los diferentes grupos fue seguida por el volumen tumoral que se determinó usando un pie de rey digital y tomando las medidas en dos dimensiones ortogonales. Los volúmenes tumorales (mm^3) se calcularon a partir de esta medición utilizando la fórmula de conversión ($\text{longitud} \times \text{anchura}^2$)/2. El volumen promedio de cada grupo +/- la desviación estándar a los 30 días está representado en la figura 7.

- 45 Los resultados demuestran que el tratamiento con LALF-E7 da lugar a una inhibición completa del crecimiento de los tumores establecidos. Estos resultados son estadísticamente significativos en comparación con los resultados obtenidos con otros tratamientos con E7, LALF y PBS ($p < 0.01$). Se obtienen resultados similares con la proteína de fusión de E7 con análogos de LALF PPC como L2, L-8, L-12 y L-20.

Ejemplo 9. Tratamiento de tumores establecidos en ratones con proteínas de fusión de PPC LALF o sus análogos con E7 (LALF-E7) y la mezcla de PPC LALF o sus análogos con E7 (LALF+E7)

- 50 Para estudiar si el efecto antitumoral de LALF-E7 estaba asociado con el enlace covalente de ambas moléculas se realizaron experimentos en los cuales se trataron ratones con LALF y E7, que se mezclaron en el momento previo a su

uso y en cantidades equimolares que permitieran una comparación con los ratones que recibieron la proteína de fusión LALF-E7.

En esta realización fueron inoculados ratones C57BL/6 con 2×10^5 células mediante inyección subcutánea en la pata derecha, en volúmenes de 0.2 mL. A los 10 días, cuando todos los animales habían desarrollado tumores palpables, los animales fueron asignados arbitrariamente a cinco grupos de tratamiento. Cada grupo incluía 10 animales.

Se realizaron dos inmunizaciones cada 14 días. El grupo 1 fue inmunizado con la proteína recombinante LALF-E7; el grupo 2 con la mezcla LALF+E7: proteína recombinante E7; el grupo 3 con el péptido sintético LALF; el grupo 4 con la proteína recombinante E7 y el grupo 5 con PBS. La cinética tumoral en los diferentes grupos fue seguida tal como se ha descrito previamente en el ejemplo 8. El volumen promedio de cada grupo +/- la desviación estándar a los 30 días está representado en la figura 8.

Los resultados mostraron que los efectos al reducir el volumen de los tumores puede verse solo con el tratamiento de ratones con la fusión covalente LALF-E7, cuyos resultados fueron estadísticamente significativos al compararse con los volúmenes que resultaron del tratamiento con la mezcla de LALF + E7, LALF, E7 y PBS ($p < 0,01$). Estos resultados son similares cuando en lugar de PPC LALF se utilizó cualquiera de sus análogos L-2, L-8, L-12 y L-20.

Ejemplo 10. Comparación de la capacidad de las preparaciones farmacéuticas para inducir respuestas inmunes celulares.

Para evaluar la respuesta inmune celular contra el antígeno E7 de VPH-16, 4 grupos de 3 ratones hembras C57BL/6, DE 6 a 8 semanas de nacidos, recibieron 2 dosis de inmunógenos. El grupo 1 fue inmunizado con 30 μg de la proteína recombinante LALF-E7; el grupo 2 con 30 μg de la proteína recombinante E7; el grupo 3 con 8 μg del péptido sintético LALF y el grupo 4 con PBS.

Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea en el flanco del animal con volúmenes de 0.2 mL y sin adyuvante. Cada 14 días se administraron dos dosis. Siete días después de la segunda inmunización, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación de la cervical y los esplenocitos fueron retirados de modo aséptico para su análisis posterior en un ensayo de ELISPOT anti-gamma interferón (anti-IFN- γ). Las suspensiones celulares de los animales por cada grupo se combinaron y se homogeneizaron suavemente. Los esplenocitos se lavaron y los eritrocitos se lisaron con una solución de NH_4Cl al 0.83%. Más tarde se lavaron y finalmente se suspendieron en un medio fresco de RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 10 U/mL de IL-2 humana (hIL-2). Fueron utilizadas células de ratón EL4 (H-2b), que no expresan epítopes de E7 de VPH-16 como células dianas, las cuales fueron pulsadas previamente a una concentración de 10 μM con el péptido $^{49}\text{RAHYNIVTF}^{57}$ correspondiente al epítipo CTL de ratón C57BL/6, H-2^b (Feltkamp M.C. et al. (1993) Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur. J. Immunol. 23:2242-2249). Más tarde fueron suspendidas las células en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y hIL-2, y se usaron como células presentadoras de antígeno. Las células EL4 no pulsadas también fueron incluidas para la determinación del fondo de células escritoras de IFN- γ .

El ensayo para la determinación de secreción de IFN- γ se realizó tal como se ha descrito previamente (Vazquez-Blomquist D. et al. (2002) Induction of a strong HIV-specific CD8+ T cell response in mice using a fowlpox virus vector expressing an HIV-1 multi-CTL-epitope polypeptide. Viral Immunol. 5(2):337-356). Las placas de 96 pozos con el fondo recubierto con papel de nitrocelulosa se recubrieron con 100 μL de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del Ab de captura y se incubaron durante toda una noche a 4 °C después de los tres lavados con PBS las placas se bloquearon con RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% durante una hora a 37 °C. Los esplenocitos (10^6 , 2×10^5 y 4×10^4 células por pozo) y las células EL4 (10^5 por pozo) fueron añadidas respectivamente en un volumen final de 0.2 mL y fueron co-incubadas en duplicado a 37 °C por ciento del CO_2 durante 17 horas. Después de la incubación se realizó un ensayo de ELISPOT estándar (Vazquez-Blomquist D. et al. (2002) Induction of to strong HIV-specific CD8+ T cell response in mice using to fowlpox virus vector expressing an Hiv-1 multi-CTL-epitope polypeptide. Viral Immunol. 5(2):337-356). Para las determinaciones de linfocitos re-estimulados in vitro se incubaron $2,8 \times 10^7$ de células de esplenocitos de cada condición con células EL4 cargadas con el péptido y con hIL-2, durante 7 días a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Después de este tiempo se contaron las células supervivientes se utilizaron para determinaciones de ELISPOT en las mismas condiciones.

Los resultados fueron expresados como el número de células formadoras de puntos (SFC) por 10^6 esplenocitos. El número de SFC fue obtenido a partir del conteo de los puntos por medio de un estereoscopio y la frecuencia se obtiene al relacionar su número con el número de células cinco balas en cada pozo.

Se consideraron positivos aquellos valores que fueron el doble del control negativo (EL4 sin péptido) más 10 SFC.

Tal como se muestra en la figura 9, el número de células efectoras secretoras de γ -IFN, es decir el número de SFC, fue superior a aproximadamente hasta 8 veces en los grupos inmunizados con LALF-E7 respecto de los grupos inmunizados con VSSP y PBS.

Estos resultados demuestran la existencia de una respuesta efectiva de linfocitos T CD8+ en los animales tratados con LALF-E7.

Estos resultados son similares cuando en lugar del PPC LALF se utilizó cualquiera de sus análogos L-2, L-8, L-12 y L-20.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN A CÉLULAS Y SU USO FUSIONADOS CON BIOMOLÉCULAS CON ACCIÓN TERAPÉUTICA

<130> patente

10 <140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: PPC LALF

20 <400> 1

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
 20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Analogue L-2

<400> 2

ES 2 610 408 T3

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Analogue L-8

<400> 3

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Ala Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
20

10 <210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Analogue L-12

<400> 4

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Ala Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
20

<210> 5

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Analogue L-20

ES 2 610 408 T3

<400> 5

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15
Gly Lys Phe Ala
20

<210> 6

<211> 75

5 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Synthetic Gen PPC LALF

<400> 6

10 catggcggaa ttccattatc gtatcaaacc gacctttcgt cgtctgaaat ggaaatataa 60
aggcaaattt tggaa 75

<210> 7

<211> 299

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Synthetic Gen E7 VPH 16

<400> 7

agcttcacat ggagatacac ctacattgca tgaatatatg ttagatttgc aaccagagac 60
aactgatctc tacggttatg agcaattaaa tgacagctca gaggaggagg atgaaataga 120
tgggccagct ggacaagcag aaccggacag agcccattac aatattgtaa ccttttgttg 180
caagtgtgac tctacgcttc ggttgtgcgt acaaagcaca cacgtagaca ttcgtacttt 240
ggaagacctg ttaatgggca cactaggaat tgtgtgcccc atctgttctc agaaaccag 299

<210> 8

20 <211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligo for sequencing

25 <400> 8

ttatggttc tgagaacaga tggggca 27

ES 2 610 408 T3

<210> 9

<211> 405

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Gen fusion PPC LALF-E7

<400> 9

```
atggcgggaat tccattatcg tatcaaaccg accttttcgtc gtctgaaatg gaaatataaa 60
ggcaaatttt ggaaagcttc acatgggatg acacctacat tgcataaata tatgttagat 120
ttgcaaccag agacaactga tctctacggt tatgagcaat taaatgacag ctcagaggag 180
gaggatgaaa tagatgggtcc agctggacaa gcagaaccgg acagagccca ttacaatatt 240
gtaacctttt gttgcaagtg tgactctacg cttcggttgt gcgtacaaag cacacacgta 300
gacattcgta ctttgaaga cctgttaatg ggcacactag gaattgtgtg ccccatctgt 360
tctcagaaac caggatcccg ggcacacat caccatcacc attaa 405
```

<210> 10

10 <211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Protein fusion PPC LALF-E7

15 <400> 10

ES 2 610 408 T3

Met Ala Glu Phe His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys
 1 5 10 15

Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe Trp Lys Ala Ser His Gly Asp Thr Pro
 20 25 30

Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu
 35 40 45

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

Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
 65 70 75 80

Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
 85 90 95

Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
 100 105 110

Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Ser Arg Ala
 115 120 125

His His His His His His
 130

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligo primer PCR-GFP

<400> 11

ccaagctca gtgagcaagg gcgaggagct 30

10 <210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligo primer PCR-GFP

<400> 12

cgggatccct tgtacagctc gtccatgccg 30

ES 2 610 408 T3

<210> 13

<211> 828

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Gen fusion PPC LALF-GFP

<400> 13

atggcggaat tccattatcg tatcaaaccg acctttcgtc gtctgaaatg gaaatataaa 60

```
ggcaaatttt ggaaagcttc agtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc 120
atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc 180
gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg 240
cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc 300
taccocgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggetacgtc 360
caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgcg cgaggtgaag 420
ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcate gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac 480
ggcaacatcc tggggcaciaa gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg 540
gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga tccgccaciaa catcgaggac 600
ggcagcgtgc agctcgccga cactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg 660
ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag 720
aagcgcgatc acatggtcct gctggagtte gtgaccgccc ccgggatcac tctcggcatg 780
gacgagctgt acaagggatc ccgggcacac catcaccatc accattaa 828
```

<210> 14

10 <211> 275

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Protein fusion PPC LALF-GFP

15 <400> 14

ES 2 610 408 T3

Met Ala Glu Phe His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe Trp Lys Ala Ser Val Ser Lys Gly Glu
20 25 30

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
35 40 45

Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
50 55 60

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
65 70 75 80

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln
85 90 95

Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys
100 105 110

Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
115 120 125

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
130 135 140

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp
145 150 155 160

Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn
165 170 175

Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe
180 185 190

Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His
195 200 205

Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
210 215 220

Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
225 230 235 240

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
245 250 255

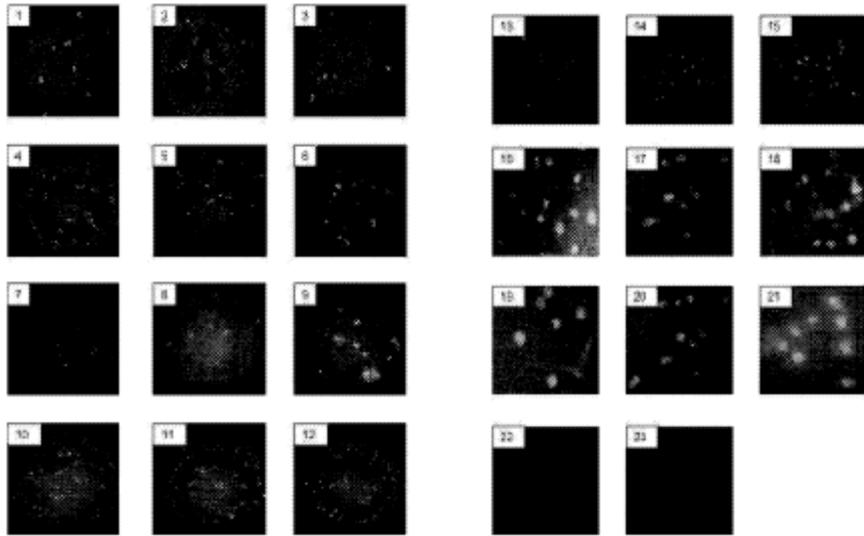
Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Ser Arg Ala His His His
260 265 270

His His His
275

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de una biomolécula fusionada a un péptido de penetración a células de SEQ ID NO:1, caracterizada porque la biomolécula es un antígeno y es de origen diferente.
- 5 2. Una proteína de fusión de una biomolécula fusionada a un péptido de penetración a células caracterizada porque dichos péptidos de penetración a células comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:5.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 2 caracterizada porque dicha biomolécula es un antígeno.
- 10 4. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o 3 caracterizada porque el antígeno es un antígeno viral, bacteriano o tumoral.
- 5 5. La proteína de fusión de la reivindicación 4 caracterizada porque dicho antígeno viral es un antígeno de virus de papiloma humano (VPH).
6. La proteína de fusión de la reivindicación 5 caracterizada porque dicho antígeno de VPH es la proteína E6 o E7 de VPH.
- 15 7. Una proteína de fusión caracterizada porque es la fusión del péptido de penetración a células de la SEQ ID NO:1 con el antígeno E7 de VPH, en cuyo caso la proteína fusionada tiene la secuencia indicada por SEQ ID NO:10.
8. Una composición farmacéutica que contiene una proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 20 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque dicha composición contiene adicionalmente un adyuvante.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque dicho adyuvante es un adyuvante completo, un adyuvante incompleto o un adyuvante de naturaleza de polipéptido.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, para uso como un medicamento o vacuna.
- 25 12. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para uso en el tratamiento de tumores que expresan un antígeno de proteína de VPH o en la prevención de proliferación de VPH, en cuyo caso dicha biomolécula es antígeno de VPH.
- 30 13. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12, caracterizada porque la composición induce una respuesta inmune contra tumores que expresan un antígeno de proteínas de VPH, en cuyo caso dicha biomolécula es antígeno de VPH.

Fig. 1



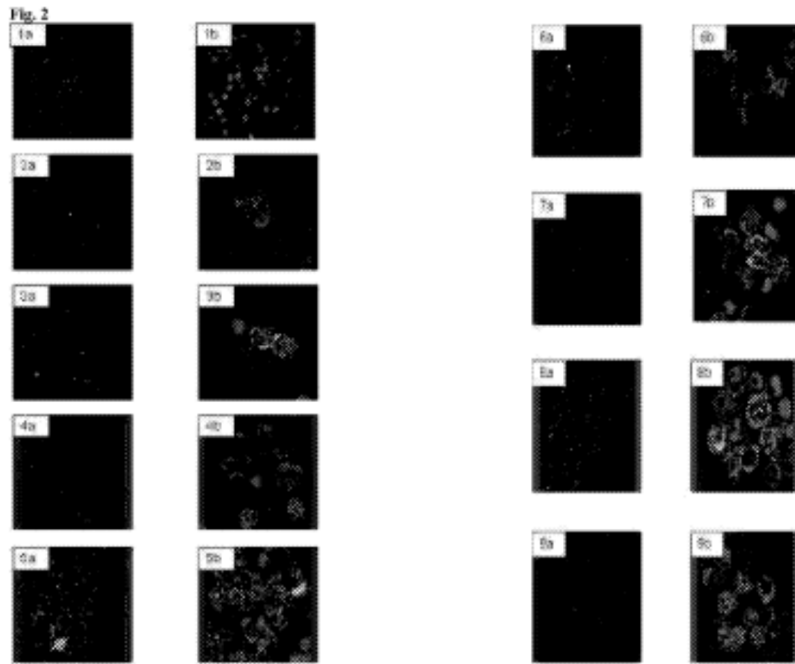


Fig. 3

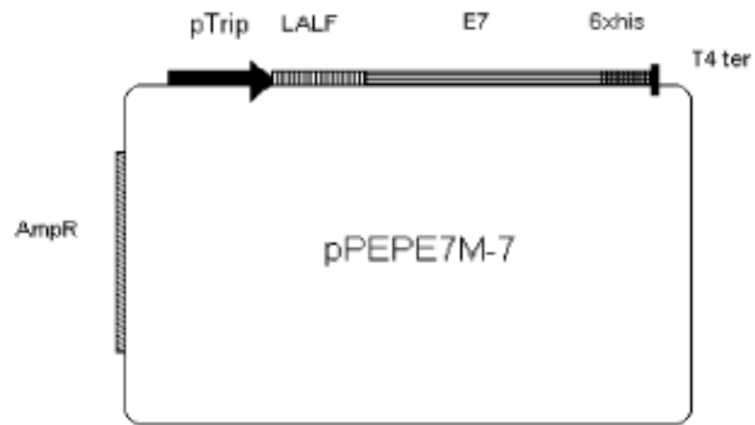


Fig. 4

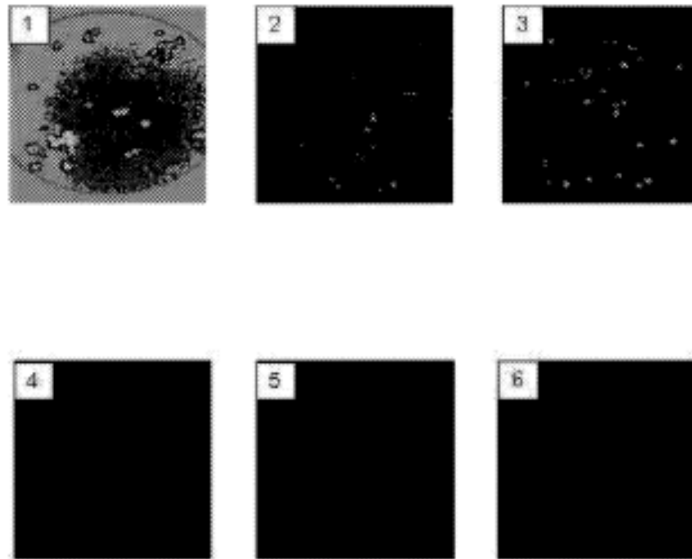


Fig. 5

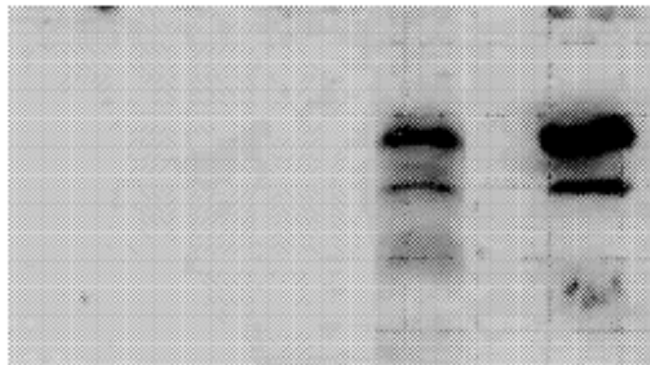


Fig. 6

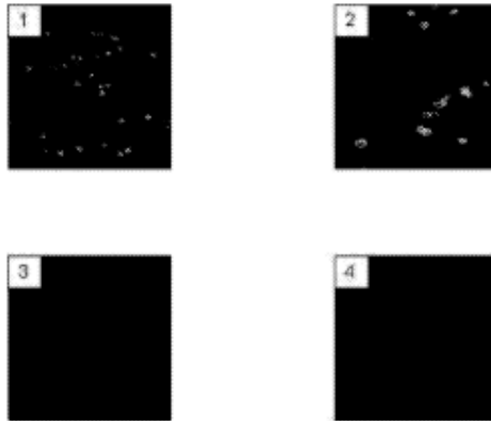


Fig. 7

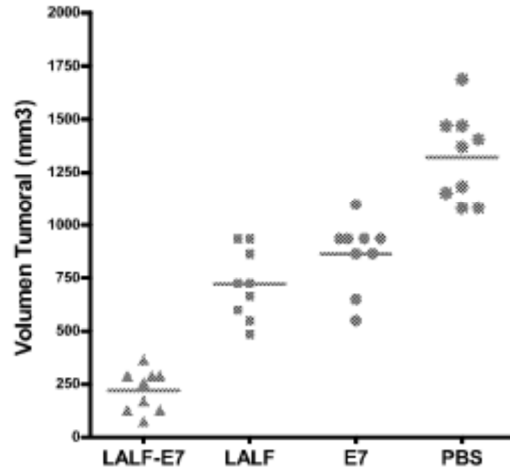


Fig. 8

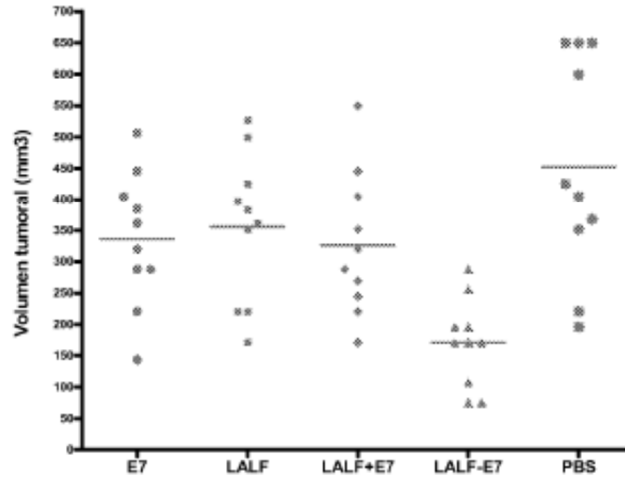


Fig. 9

