



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0414845-2 B1



(22) Data do Depósito: 24/09/2004

(45) Data de Concessão: 13/10/2020

(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA DE LEVEDURA, PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS, BEM COMO MÉTODO PARA PRODUIR A DITA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS

(51) Int.Cl.: A61K 39/12; C12N 15/37; C12N 15/81; C07K 14/025.

(30) Prioridade Unionista: 29/09/2003 US 60/506,812.

(73) Titular(es): MERCK SHARP & DOHME CORP..

(72) Inventor(es): JANINE T. BRYAN; MICHELLE K. BROWNLOW; LOREN D. SCHULTZ; KATHRIN U. JANSEN.

(86) Pedido PCT: PCT US2004031326 de 24/09/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/032586 de 14/04/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/03/2006

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS, MÉTODO PARA PRODUIR AS PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS. VACINA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, E, MÉTODOS PARA PREVENIR INFECÇÃO POR HPV E PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL. Moléculas de DNA sintéticas codificadoras de proteína HPV45 L1 são providas. Especificamente, a presente invenção proporciona polinucleotídeos codificadores de proteína HPV45 L1, na qual os citados polinucleotídeos têm sido códon-otimizados para expressão de alto nível em uma célula de levedura. As moléculas sintéticas podem ser usadas para produzir partículas semelhantes ao vírus HPV45 (VLPs), e para produzir vacinas e composições farmacêuticas compreendendo HPV45 VLPs. As vacinas da presente invenção proporcionam imunoprevenção efetiva contra infecção pelo papilomavírus por meio de imunidade mediada por célula e anticorpo neutralizador.

“MÓLECULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA DE
LEVEDURA, PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS, BEM COMO
MÉTODO PARA PRODUZIR A DITA PARTÍCULA SEMELHANTE A
VÍRUS”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se em geral à terapia de papilomavírus de humano (HPV). Mais especificamente, a presente invenção refere-se aos polinucleotídeos sintéticos codificadores de proteína HPV45 L1, e aos vetores recombinantes e aos hospedeiros compreendendo os citados polinucleotídeos. Esta invenção também se refere às partículas semelhantes ao vírus HPV45 (VLPs), na qual as VLPs são produzidas pela expressão de L1 ou de L1 + L2 recombinantes de HPV45 em células de levedura e ao seu uso em vacinas e composições farmacêuticas para prevenir e tratar HPV.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Há mais do que 80 tipos de papilomavírus de humano (HPV), muitos dos quais têm estado associados com uma ampla variedade de fenótipos biológicos, desde verrugas proliferativas benignas a até carcinomas malignos (para revisão, veja McMurray *et al.*, *Int. J. Exp. Pathol.* 82(1): 15-33 (2001)). HPV6 e HPV11 são os tipos mais comumente associados com verrugas benignas e/ou condiloma acuminado não maligno de mucosa genital ou respiratória. HPV16 e HPV18 são os tipos de alto risco mais freqüentemente associados com carcinomas *in situ* e invasivos da cerviz, da vagina, da vulva e do canal anal. Mais do que 90% dos carcinomas cervicais estão associados com infecções de HPV16, HPV18 ou com os tipos oncogênicos menos prevalentes HPV31, -33, -45, -52 e -58 (Schiffman *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 85(12): 958-64 (1993)). A observação de que o DNA de HPV é detectado em mais do que 90% dos cânceres cervicais proporciona evidência epidemiológica forte de que os HPVs causam carcinoma cervical

“MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS, MÉTODO PARA PRODUZIR AS PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS, VACINA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, E, MÉTODOS PARA PREVENIR INFECÇÃO POR HPV E PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL”

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se em geral à terapia de papilomavírus de humano (HPV). Mais especificamente, a presente invenção refere-se aos polinucleotídeos sintéticos codificadores de proteína HPV45 L1, e aos vetores recombinantes e aos hospedeiros compreendendo os citados polinucleotídeos. Esta invenção também se refere às partículas semelhantes a vírus HPV45 (VLPs), na qual as VLPs são produzidas pela expressão de L1 ou de L1 + L2 recombinantes de HPV45 em células de levedura e ao seu uso em vacinas e composições farmacêuticas para prevenir e tratar HPV.

15 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Há mais do que 80 tipos de papilomavírus de humano (HPV), muitos dos quais têm estado associados com uma ampla variedade de fenótipos biológicos, desde verrugas proliferativas benignas a até carcinomas malignos (para revisão, veja McMurray *et al.*, *Int. J. Exp. Pathol.* 82(1): 15-33 (2001)). HPV6 e HPV11 são os tipos mais comumente associados com verrugas benignas e/ou condiloma acuminado não maligno de mucosa genital ou respiratória. HPV16 e HPV18 são os tipos de alto risco mais freqüentemente associados com carcinomas *in situ* e invasivos da cerviz, da vagina, da vulva e do canal anal. Mais do que 90% dos carcinomas cervicais estão associados com infecções de HPV16, HPV18 ou com os tipos oncogênicos menos prevalentes HPV31, -33, -45, -52 e -58 (Schiffman *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 85(12): 958-64 (1993)). A observação de que o DNA de HPV é detectado em mais do que 90% dos cânceres cervicais proporciona evidência epidemiológica forte de que os HPVs causam carcinoma cervical

(veja Bosch *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 87(11): 796-802 (1995)).

Os papilomavírus são vírus de DNA icosaédricos, não envelopados, pequenos (50-60 nm) que codificam até oito genes precoces e dois genes tardios. As matrizes de leitura aberta (ORFs) dos genomas virais são chamadas de E1 a E7, e L1 e L2, nas quais "E" denota precoce e "L" tardio. L1 e L2 codificam proteínas de capsídeo do vírus, enquanto que os genes E estão associados com funções tais como replicação viral e transformação celular.

A proteína L1 é a maior proteína de capsídeo e possui um peso molecular de 55-60 kDa. A proteína L2 é a menor proteína de capsídeo. Dados imunológicos sugerem que a maior parte da proteína L2 é interna à proteína L1 no capsídeo viral. Ambas as proteínas L1 e L2 estão elevadamente conservadas dentre os papilomavírus diferentes.

A expressão da proteína L1 ou de uma combinação de proteínas L1 e L2 em células de levedura, de inseto, células de mamífero ou em bactérias acarreta a auto-montagem das partículas semelhantes a vírus (VLPs) (para revisão, veja, Schiller e Roden, em *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*; Lac ey, ed. Leeds, UK: Leeds Medical Information, pp. 101-12 (1996)). VLPs são morfologicamente semelhantes aos vírions autênticos e são capazes de induzir títulos altos de anticorpos neutralizadores sob administração em um animal. Devido ao fato de as VLPs não conterem o genoma viral potencialmente oncogênico, elas apresentam uma alternativa segura para o uso de vírus vivo em desenvolvimento de vacina de HPV (para revisão, veja Schiller e Hidersheim, *J. Clin. Virol.* 19:67-74 (2000)). Por este motivo, os genes L1 e L2 têm sido identificados como alvos imunológicos para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas para a doença e a infecção por HPV.

O desenvolvimento e a comercialização de vacina de HPV têm sido impedidos por dificuldades associadas com a obtenção de níveis de

expressão altos de genes exógenos em organismos hospedeiros bem sucedidamente transformados, limitando a produção de proteína purificada. Portanto, a despeito da identificação das seqüências de nucleotídeos de tipo selvagem codificadoras de proteínas HPV L1 tal como a proteína HPV45 L1, seria elevadamente desejável o desenvolvimento de uma fonte prontamente renovável de proteína HPV L1 bruta que utilize as seqüências de nucleotídeos codificadoras de HPV45 L1 que estão otimizadas para a expressão na célula hospedeira intencionada. Adicionalmente, seria útil produzir quantidades grandes de HPV45 L1 VLPs possuindo as propriedades proporcionadoras de imunidade das proteínas nativas para utilização em desenvolvimento de vacina.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se às composições e aos métodos para gerar ou intensificar imunidade aos produtos de proteína expressados pelos genes HPV45 L1, que têm estado associados com câncer cervical. Especificamente, a presente invenção proporciona polinucleotídeos codificadores de proteína HPV45 L1, na qual os polinucleotídeos têm sido códon-otimizados para expressão de alto nível em uma célula de levedura. A presente invenção adicionalmente proporciona partículas semelhantes ao vírus HPV45 (VLPs), na qual as citadas VLPs são produzidas pela expressão de L1 ou de L1 + L2 de HPV45 recombinantes em células de levedura e descreve o uso de HPV45 VLPs em composições farmacêuticas e vacinas para a prevenção e/ou o tratamento de câncer associado com HPV.

A presente invenção refere-se às moléculas de DNA sintéticas codificadoras de proteína HPV45 L1. Os códons das moléculas sintéticas estão planejados de modo que uma célula de levedura use os códons preferidos. As moléculas sintéticas podem ser utilizadas como uma fonte de proteína HPV45 L1, que pode ser auto-montável em VLPs. As citadas VLPs podem ser empregadas em uma vacina baseada em VLP.

Uma modalidade exemplar da presente invenção compreende uma molécula de ácido nucleico sintética que codifica a proteína L1 de HVP45 como apresentada na SEQ ID NO: 2, a citada molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos como apresentada na SEQ ID NO: 1.

Também são proporcionados vetores recombinantes e células hospedeiras recombinantes, tanto procarióticas quanto eucarióticas, que contêm as moléculas de ácido nucleico descritas em todo este relatório descritivo.

A presente invenção também se refere a um processo para expressar uma proteína HPV45 L1 em uma célula hospedeira recombinante, compreendendo: (a) introduzir um vetor compreendendo um ácido nucleico codificador de uma proteína HPV45 L1 em uma célula hospedeira de levedura; e (b) cultivar a célula hospedeira de levedura sob condições que também permitem a expressão da citada proteína HPV45 L1.

A presente invenção refere-se em adição a um processo para expressar uma proteína HPV45 L1 em uma célula hospedeira recombinante, compreendendo: (a) introduzir um vetor compreendendo um ácido nucleico codificador de uma proteína HPV45 L1 em uma célula hospedeira; sendo que a molécula de ácido nucleico está códon-otimizada para ótima expressão em célula hospedeira de levedura e; (b) cultivar a célula hospedeira de levedura sob condições que permitem a expressão de citada proteína HPV45 L1.

Em modalidades preferidas, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos como apresentada na SEQ ID NO: 1 (sequência 45 L1 R).

Esta invenção também se refere às partículas semelhantes a vírus HPV45 (VLPs) que são produzidas em células de levedura, aos métodos de produção de HPV45 VLPs, e aos métodos de uso de HPV45 VLPs.

Em uma modalidade preferida da invenção, a levedura é

selecionada do grupo consistindo de: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, e *Schizosaccharomyces pombe*.

- Outro aspecto desta invenção é uma HPV45 VLP, no qual a
- 5 VLP é produzida pela expressão recombinante de HPV45 L1 ou L1 + L2 em uma célula de levedura.

- Ainda outro aspecto desta invenção é uma HPV45 VLP que compreende uma proteína HPV45 L1 codificada por um gene HPV45 L1 códon-otimizado. Em uma modalidade exemplar deste aspecto da invenção, o
- 10 gene HPV45 L1 códon-otimizado compreende uma sequência de nucleotídeos como apresentada em SEQ ID NO: 1.

- Esta invenção também proporciona um método para induzir uma resposta imune em um animal compreendendo administrar partículas semelhantes ao vírus HPV45 ao animal. Em uma modalidade preferida, as
- 15 HPV45 VLPs são produzidas por um gene códon-otimizado.

- Ainda outro aspecto desta invenção é um método de prevenir ou de tratar câncer cervical associado com HPV compreendendo administrar a um mamífero uma vacina compreendendo HPV45 VLPs. Em uma modalidade preferida deste aspecto da invenção, as HPV45 VLPs são
- 20 produzidas em levedura.

Esta invenção também se refere a uma vacina compreendendo partículas semelhantes a vírus HPV45 (VLPs).

- Em uma modalidade alternativa deste aspecto da invenção, a vacina compreende adicionalmente VLPs de pelo menos um tipo de HPV
- 25 opcional. O pelo menos um tipo de HPV opcional pode ser de qualquer tipo de HPV de interesse, incluindo qualquer tipo de HPV descrito na técnica ou aqueles subsequentemente identificados. Em uma modalidade preferida, o tipo de HPV é um tipo que está associado com um fenótipo clínico tal como verrugas ou câncer cervical. Em uma outra modalidade preferida, o pelo

menos um tipo de HPV adicional é selecionado do grupo consistindo de: HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV51, HPV52, HPV55, HPV56, HPV58, HPV59, e HPV68.

5 Esta invenção também se refere às composições farmacêuticas compreendendo as partículas semelhantes a vírus HPV45. Em adição, esta invenção refere-se às composições farmacêuticas compreendendo HPV45 VLPs e VLPs de pelo menos um tipo de HPV adicional. Em uma modalidade preferida, o pelo menos um tipo de HPV adicional é selecionado do grupo consistindo de: HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV51, HPV52, HPV55, HPV56, HPV58, HPV59, e HPV68.

10 Como usadas em todo o relatório descritivo e nas reivindicações apendidas, as formas no singular de "um", "uma", e "o", "a" incluem as correspondentes no plural a não ser que o contexto dite claramente o contrário.

15 Como usadas em todo o relatório descritivo e nas reivindicações apendidas, as seguinte definições e aplicações se aplicam:

20 O termo "promotor" refere-se a um sítio de reconhecimento em uma fita de DNA no qual a RNA polimerase se liga. O promotor forma um complexo de iniciação com RNA polimerase para iniciar e conduzir a atividade de transcrição. O complexo pode ser modificado por seqüências ativadoras chamadas de "intensificadoras" ou "seqüências ativadoras a montante" ou seqüências inibidoras chamadas de "silenciadoras".

25 O termo "vetor" refere-se a alguns meios pelos quais os fragmentos de DNA podem ser introduzidos em um organismo hospedeiro ou tecido hospedeiro. Há vários tipos de vetores incluindo plasmídeos, vírus (incluindo adenovírus), bacteriófagos e cosmídeos.

A designação "seqüência de tipo selvagem 45 L1" refere-se à seqüência de HPV45 L1 DNA aqui descrita como SEQ ID NO: 3 (45 L1 wt). Embora a seqüência de HPV 45 L1 DNA de tipo selvagem tenha sido descrita

5 previamente, não é incomum encontrar variações de sequência menores entre os DNAs obtidos de isolados clínicos. Portanto, uma sequência de 45 L1 DNA de tipo selvagem representativa foi isolada de amostras clínicas, as quais, como previamente mostrado, contêm HPV45 DNA (veja EXEMPLO 1). A sequência 45 L1 de tipo selvagem foi usada como uma sequência de referência em comparação com as sequências 45 L1 códon-otimizadas aqui descritas (veja FIGURA 1).

10 A designação "HPV 45 L1 R" ou "45 L1 R" refere-se a uma sequência de nucleotídeos HPV45 L1 sintética (SEQ ID NO: 1), aqui descrita, na qual a sequência foi reconstruída de modo que compreendesse códons que são preferidos para a expressão de alto nível por uma célula de levedura.

15 O termo "quantidade efetiva" significa que composição de vacina suficiente é introduzida para produzir os níveis adequados de polipeptídeo, de modo que resulte uma resposta imune. Uma pessoa experiente na técnica reconhecerá que este nível pode variar.

20 Uma "substituição de aminoácido conservativa" refere-se à substituição de um resíduo de aminoácido por outro, resíduo de aminoácido quimicamente semelhante. Exemplos de tais substituições conservativas são: substituição de um resíduo hidrofóbico (isoleucina, leucina, valina, ou metionina) por outro/ substituição de um resíduo polar por outro resíduo polar de mesma carga (por exemplo, lisina por arginina; ácido aspártico por ácido glutâmico).

25 O termo "mamífero" refere-se a qualquer mamífero, incluindo um ser humano.

"VLP" ou "VLPs" significa(m) partícula semelhante a vírus ou partículas semelhantes a vírus.

"Sintético" significa que o gene HPV45 L1 foi preparado de modo a conter uma sequência de nucleotídeos que não é igual à sequência de nucleotídeos presente no gene HPV45 L1 de tipo selvagem naturalmente

ocorrente (45 L1 wt, SEQ ID NO: 3). Como enunciado acima, moléculas sintéticas são aqui proporcionadas compreendendo uma seqüência de nucleotídeos compreendendo códons que são preferidos para a expressão por células de levedura. As moléculas sintéticas aqui proporcionadas codificam a mesma seqüência de aminoácidos que a do gene HPV45 L1 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2).

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

FIGURA 1 é um alinhamento de seqüências de DNA mostrando nucleotídeos que foram alterados no gene HPV45 L1 sintético da presente invenção (SEQ ID NO: 1, indicada como "45 L1 R") (veja EXEMPLO 2). A seqüência de referência é a seqüência 45 L1 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 3, indicada como "45 L1 wt"; veja EXEMPLO 1). Nucleotídeos alterados são indicados em sua localização correspondente. Número de nucleotídeos está contido entre parênteses. Nucleotídeos idênticos na seqüência reconstruída 45 L1 estão indicados com pontos.

FIGURA 2 mostra as seqüências de aminoácidos de código único e de nucleotídeos HPV 45 L1 sintéticas reconstruídas. O número de nucleotídeos está indicado à esquerda.

FIGURA 3 mostra um Northern blot sondado especificamente para HPV 45 L1 RNA sob condições de estringência alta (veja EXEMPLO 4). Faixa (1) contém 5 µg de HPV 45 L1 RNA e faixa (2) contém 10 µg de HPV 45 L1 R RNA. Um transcrito de RNA de comprimento total é evidente sobre o blot. Seta à esquerda indica a posição predita de um transcrito de HPV 45 L1 de comprimento total.

FUGURA 4 mostra um Western Blot de HPV45 L1 wt e de três isolados de HPV 45 L1. Conteúdos das faixas são: 45 L1 wt (faixa 1), 45 L1 R #4 (faixa 2), 45 L1 R #7 (faixa 3), 45 L1 R #1 (faixa 4), HPV 16 L1 controle (faixa 5). Quinze microgramas de extrato de proteína de levedura total foram carregados para dentro de cada faixa de um gel de 10% SDS-

PAGE. Um anti-soro policlonal de cabra contra uma proteína de fusão TrpE-HPV 45 L1 foi usado para especificamente identificar a proteína HPV 45 L1. A seta à esquerda indica a posição de 55 kDa.

FIGURA 5 mostra uma porção dos dados de dois experimentos de ELISA em ng de VLP/ μ g de proteína total (veja EXEMPLO 7). Uma comparação entre 45 L1 wt e dois clones separados de 45 L1 R, é mostrada. Expressão de HPV 45 L1 VLP reconstruída foi de aproximadamente 2 vezes maior do que a de 45 L1 wt.

FIGURA 6 mostra uma amostra representativa de HPV 45 VLPs compostas de moléculas de proteína HPV 45 L1 R, aqui descritas, como visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (veja EXEMPLO 8). A barra representa aproximadamente 100 nm.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os carcinomas cervicais estão em sua maioria associados com infecções de tipos de oncogenes específicos de papilomavírus de humano (HPV). A presente invenção refere-se às composições e aos métodos para gerar ou intensificar a imunidade aos produtos de proteína expressados por genes de tipos de HPV oncogênicos. Especificamente, a presente invenção proporciona polinucleotídeos codificadores de proteína HPV45 L1, que se auto-montam em partículas semelhantes a vírus HPV45 (VLPs) e descreve o uso de citados polinucleotídeos e VLPs em composições farmacêuticas e vacinas para a prevenção e/ou o tratamento de câncer associado com HPV.

A sequência de nucleotídeos HPV45 L1 de tipo selvagem tem sido relatada (Número de Acesso no GenBank: NC_001590; veja também Delius e Hofman, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186: 13-31 (1994)). A presente invenção proporciona moléculas de DNA sintéticas codificadoras de proteína HPV45 L1. As moléculas sintéticas da presente invenção compreendem uma sequência de códons, na qual pelo menos uma porção dos códons tem sido alterada para que uma célula de levedura use os códons

preferidos para expressão de nível alto. As moléculas sintéticas podem ser utilizadas como uma sequência codificadora para expressão de proteína HPV45 L1, que pode se auto-montar em VLPs. As citadas VLPs podem ser utilizadas em uma vacina baseada em VLP para proporcionar imunoprofilaxia efetiva contra infecção por papilomavírus por intermédio de imunidade mediada por célula e anticorpo neutralizador.

A expressão de HPV VLPs em células de levedura oferece as vantagens de ser custo-efetiva e facilmente adaptada ao crescimento de grande escala em fermentadores. Contudo, as proteínas HPV L1, incluindo HPV45 L1 são expressadas em níveis nas células de levedura que são menores do que aquele que é desejável para aumento de escala comercial.

Conseqüentemente, a presente invenção refere-se às sequências de gene HPV45 L1 que estão "otimizados" para expressão em nível alto em um ambiente celular de levedura.

Um códon "triplete" de quatro bases de nucleotídeo pode existir em mais de 60 formas variantes. Devido ao fato de estes códons proporcionarem a mensagem para apenas 20 aminoácidos diferentes (bem como iniciação e terminação de transcrição), alguns aminoácidos podem ser codificados por mais do que um códon, um fenômeno conhecido como redundância de códon. Por razões não completamente entendidas, códons alternativos não estão uniformemente presentes no DNA endógeno de tipos diferentes de células. De fato, parece que há uma "preferência" ou hierarquia natural variável para certos códons em certos tipos de células. Como um exemplo, o aminoácido leucina é especificado por qualquer um de seis códons de DNA incluindo CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, e TTG. Análise exaustiva de frequências de uso de códon de genoma para microorganismos tem revelado que DNA endógeno de *E. coli* contém mais comumente o códon CTG especificador de leucina, enquanto que o DNA de leveduras e de bolores de lodo inclui mais comumente um códon TTA especificador de leucina. Em

vista desta hierarquia, acredita-se em geral que a possibilidade de se obterem níveis altos de expressão de um polipeptídeo rico em leucina por um hospedeiro *E. coli* dependerá em alguma extensão da frequência de uso de códon. Por exemplo, é provável que um gene rico em códons TTA seja insatisfatoriamente expressado em *E. coli*, enquanto que um gene rico em CTG seja provavelmente elevadamente expressado neste hospedeiro. De maneira semelhante, um códon preferido para expressão de um polipeptídeo rico em leucina em células hospedeiras de levedura seria TTA.

As implicações dos fenômenos de preferência de códon sobre as técnicas de DNA recombinante são manifestas, e o fenômeno pode servir para explicar muitas falhas anteriores para se alcançarem níveis altos de expressão de genes exógenos em organismos hospedeiros bem sucedidamente transformados -- um códon menos "preferido" pode estar repetidamente presente no gene inserido e o maquinário da célula hospedeira para expressão pode não operar tão eficientemente. Este fenômeno sugere que os genes sintéticos que têm sido planejados para incluírem códons preferidos de células hospedeiras planejado proporcionam uma forma ótima de material genético estranho para a prática da expressão de proteína recombinante. Assim, um aspecto desta invenção é um gene HPV45 L1 que está códon-otimizado para a expressão de nível alto em uma célula de levedura. Em uma modalidade preferida desta invenção, tem sido verificado que o uso de códons alternativos codificadores de mesma sequência de proteína pode remover as restrições sobre a expressão de proteínas HPV45 L1 por células de levedura.

De acordo com esta invenção, segmentos de gene HPV45 L1 convertidos em sequências possuindo sequências traduzidas idênticas mas com uso de códon alternativo como descrito por Sharp e Cowe (Synonymous Codon Usage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 657-678 (1991)), que é por meio desta aqui incorporada como referência. A metodologia em geral consiste da identificação de códons na sequência de tipo selvagem que não

estão comumente associados com genes de levedura elevadamente expressados e da substituição deles por códons ótimos para expressão alta em células de levedura. A sequência de gene nova é então inspecionada para as sequências indesejadas geradas por estas substituições de códon (por exemplo, sequências "ATTTA", formação inadvertida de sítios de reconhecimento de editoração de íntron, sítios de enzima de restrição indesejados, conteúdo de GC elevado, presença de sinais de terminação de transcrição que são reconhecidos por levedura, etc.). Sequências indesejáveis são eliminadas por substituição dos códons existentes por códons diferentes codificadores de mesma aminoácido. Os segmentos de gene sintéticos são então testados para expressão melhorada.

Os métodos descritos acima foram usados para preparar segmentos de gene sintéticos para HPV45 L1, resultando em um gene compreendendo códons otimizados para expressão de nível alto em um ambiente de célula de levedura. Embora o procedimento acima proporcione um sumário de nossa metodologia para planejamento de genes códon-otimizados para uso em vacinas de HPV, é entendido por uma pessoa experiente na técnica que eficácia de vacina semelhante ou expressão aumentada de genes pode ser realizada por variações mínimas no procedimento ou por variações mínimas na sequência.

Conseqüentemente, a presente invenção se refere a um polinucleotídeo sintético compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificadora de uma proteína HPV45 L1, ou de um fragmento biologicamente ativo ou de uma forma mutante biologicamente ativa de uma proteína HPV45 L1, a sequência de polinucleotídeo compreendendo códons otimizados para expressão em uma célula hospedeira de levedura. As citadas formas mutantes de proteína HPV45 L1 incluem, mas não estão limitadas a: substituições de aminoácido conservativas, trunicações de terminação-amino, trunicações de terminação-carboxila, deleções ou adições. Qualquer um de tal fragmento

e/ou mutante biologicamente ativo codificará quer uma proteína quer um fragmento que pelo menos substancialmente imita as propriedades imunológicas da proteína HPV45 L1 como apresentada na SEQ ID NO: 2. Os polinucleotídeos sintéticos da presente invenção codificam moléculas de mRNA que expressam uma proteína HPV45 L1 funcional de modo a serem úteis no desenvolvimento de uma vacina de HPV terapêutica ou profilática.

Um aspecto desta invenção é uma molécula de ácido nucleico códon-otimizada que codifica a proteína HPV45 L1 com apresentada na SEQ ID NO: 2, a citada molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos como apresentada na SEQ ID NO: 1.

A presente invenção também se refere aos vetores recombinantes e às células hospedeiras recombinantes, tanto procarióticas quanto eucarióticas, que contêm as moléculas de ácido nucleico descritas em todo este relatório descritivo.

O HPV45 DNA sintético ou seus fragmentos construído por meio dos métodos aqui descritos podem ser recombinantemente expressados por clonagem molecular em um vetor de expressão contendo um promotor adequado e outros elementos regulatórios de transcrição apropriados, e transferido para dentro de células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas para produzir HPV45 L1 recombinante. Técnicas para tais manipulações são totalmente descritas por Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, Green Pub. Associates e Wiley-Interscience, New York (1988); *Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Rose *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1990)), que são por meio desta aqui incorporadas em suas totalidades como referências.

Assim, a presente invenção refere-se a um processo para expressar uma proteína HPV45 L1 em uma célula hospedeira recombinante,

compreendendo: (a) introduzir um vetor compreendendo um ácido nucleico codificador de uma proteína HPV45 L1 em uma célula hospedeira de levedura; e (b) cultivar a célula hospedeira de levedura sob condições que permitem a expressão de citada proteína HPV45 L1.

- 5 Esta invenção refere-se em adição a um processo para expressar uma proteína HPV45 L1 em uma célula hospedeira recombinante, compreendendo: (a) introduzir um vetor compreendendo um ácido nucleico como apresentado na SEQ ID NO: 1 em uma célula hospedeira de levedura; e (b) cultivar a célula hospedeira de levedura sob condições que permitem a expressão de citada proteína HPV45 L1.

- 10 Os genes sintéticos da presente invenção podem ser montados em um cassete de expressão que compreende seqüências planejadas para proporcionarem expressão eficiente da proteína HPV45 L1 na célula hospedeira. O cassete preferivelmente contém o gene sintético, com
15 seqüências de controle de transcrição e de traduções relacionadas operativamente ligadas nele, tais como um promotor, e seqüências de terminação. Em uma modalidade preferida, o promotor é o promotor *S. cerevisiae GAL1*, embora aquelas pessoas experientes na técnica reconheçam que qualquer um de numerosos outros promotores de levedura conhecidos
20 possam ser utilizados. Um terminador de transcrição preferido é o terminador *S. cerevisiae ADHI*, embora outros terminadores de transcrição conhecidos também possam ser empregados. A combinação de promotor *GAL1* - terminador *ADHI* é particularmente preferida.

- 25 Outro aspecto desta invenção é uma partícula semelhante a vírus HPV45 (VLP) produzida por expressão recombinante de genes HPV45 L1 ou L1 + L2 em uma célula de levedura, métodos de produção de HPV45 VLPs, e métodos de uso de HPV45 VLPs. VLPs podem se auto-montar quando L1, a proteína de capsídeo maior de papilomavírus de humano e de animal, for expressada em célula de levedura, células de inseto, células de

- mamífero ou bactérias (para revisão, veja Schiller e Roden, em *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*; Lac ey, ed. Leeds, UK: Leeds Medical Information, pp. 101-12 (1996)). HPV VLPs morfológicamente distintas também podem ser produzidas pela expressão de
- 5 uma combinação de proteínas de capsídeo L1 e L2. VLPs são compostas de
 - 72 pentâmeros de L1 em uma estrutura icosaédrica T=7 (Baker *et al.*, *Biophys. J.* 60(6): 1445-56 (1991)).

VLPs são morfológicamente semelhantes aos vírions autênticos e são capazes de induzir títulos altos de anticorpos neutralizadores sob administração em um animal. Foi mostrado que imunização de coelhos (Breitburd *et al.*, *J. Virol.* 69(6): 3959-63 (1995)) e de cães (Suzich *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(25): 11553-57 (1995)) com VLPs em ambos induz anticorpos neutralizadores e protege contra infecção por papilomavírus experimental. Contudo, devido ao fato de as VLPs não conterem o genoma

15 viral potencialmente oncogênico e poderem se auto-montar quando expressadas de um gene único, elas apresentam uma alternativa segura ao uso de vírus vivo no desenvolvimento de vacina de HPV (para revisão, veja Schiller e Hidesheim, *J. Clin. Virol.* 19: 67-74 (2000)).

- Marais e colegas (*J. Med. Virol.* 60: 331-336 (2000))
- 20 descrevem HPV45 VLPs, que foram produzidas em células de inseto a partir de um gene HPV45 L1 expressado de baculovírus. A expressão de VLPs em células de inseto não é vantajosa para o desenvolvimento de vacina por causa dos custos altos associados. Adicionalmente, muitas vezes é difícil aumentar a escala da expressão de genes HPV L1 em cultura de células de inseto para
 - 25 volumes grandes necessários para o desenvolvimento de produto comercial. HPV45 VLPs produzidas em células de levedura não têm sido descritas. A expressão de HPV VLPs em células de levedura oferece as vantagens de ser custo-efetiva e facilmente adaptada ao crescimento de escala grande em fermentadores. Em adição, o genoma de levedura pode ser prontamente

alterado para garantir a seleção de levedura transformada, recombinante, com potencial de crescimento e de expressão aumentado.

Assim, a presente invenção refere-se às partículas semelhantes a vírus compreendidas de proteína L1 recombinante ou de proteínas L1 + L2 recombinantes de HPV45, na qual a proteína recombinante é expressada em uma célula de levedura.

Em uma modalidade preferida da invenção, as HPV45 VLPs são produzidas pela expressão de HPV45 L1 ou de HPV45 L1 + L2 em uma levedura selecionada do grupo consistindo de: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, e *Schizosaccharomyces pombe*.

Outro aspecto desta invenção é uma HPV45 VLP que compreende uma proteína HPV45 L1 produzida pela expressão de um gene HPV45 L1 códon-otimizado. Em uma modalidade preferida deste aspecto da invenção, o gene HPV45 L1 códon-otimizado compreende uma sequência de nucleotídeos como apresentada na SEQ ID NO: 1.

Ainda outro aspecto desta invenção é um método de produzir HPV45VLPs, compreendendo: (a) transformar levedura com uma molécula de DNA recombinante codificadora de proteína HPV45 L1 ou de proteínas HPV45 L1 + L2; (b) cultivar a levedura transformada sob condições que permitem a expressão da molécula de DNA recombinante para produzir a proteína HPV45 recombinante; e (c) isolar a proteína HPV45 recombinante para produzir HPV45 VLPs.

Em uma modalidade preferida deste aspecto da invenção, a levedura é transformada com um gene HPV45 L1 códon-otimizado para produzir HPV45 VLPs. Em uma modalidade particularmente preferida, o gene HPV45 L1 códon-otimizado compreende uma sequência de nucleotídeos como apresentada na SEQ ID NO: 1.

Esta invenção também proporciona um método de induzir uma

resposta imune em um animal compreendendo administrar partículas semelhantes a vírus HPV45 ao animal. Em uma modalidade preferida, as HPV45 VLPs são produzidas por um gene códon-otimizado.

- 5 Ainda outro aspecto desta invenção é um método de prevenir ou tratar câncer cervical associado com HPV compreendendo administrar a um mamífero uma vacina compreendendo HPV45 VLPs. Em uma modalidade preferida deste aspecto da invenção, as HPV45 VLPs são produzidas em levedura.

10 Esta invenção também se refere a uma vacina compreendendo partículas semelhantes a vírus (VLPs).

Em uma modalidade alternativa deste aspecto da invenção, a vacina compreende adicionalmente VLPs de pelo menos um tipo de HPV adicional. Em uma modalidade preferida, o pelo menos um tipo de HPV adicional é selecionado do grupo consistindo de: HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV51, HPV52, HPV55, HPV56, HPV58, HPV59, e HPV68.

Em uma modalidade preferida deste aspecto da invenção, a vacina compreende adicionalmente HPV16 VLPs.

20 Em outra modalidade preferida da invenção, a vacina compreende adicionalmente HPV16 VLPs e HPV18 VLPs.

Em ainda outra modalidade preferida da invenção, a vacina compreende adicionalmente HPV16 VLPs, HPV11 VLPs, HPV16 VLPs e HPV18 VLPs.

25 Esta invenção também se refere às composições farmacêuticas compreendendo partículas semelhantes a vírus HPV45. Em adição, esta invenção refere-se às composições farmacêuticas compreendendo HPV45 VLPs e VLPs de pelo menos um tipo de HPV adicional. Em uma modalidade preferida, o pelo menos um tipo de HPV adicional é selecionado do grupo consistindo de: HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35,

HPV39, HPV51, HPV52, HPV55, HPV56, HPV58, HPV59, e HPV68.

Composições de vacina da presente invenção podem ser usadas sozinhas em dosagens apropriadas definidas por teste rotineiro com o propósito de se obter inibição ótima de infecção por HPV45 ao mesmo tempo minimizando qualquer toxicidade potencial. Em adição, a co-administração ou administração sequencial de outros agentes pode ser desejável.

A quantidade de partículas semelhantes a vírus a ser introduzida em um recipiente de vacina dependerá da imunogenicidade do produto de gene expressado. Em geral, uma dose imunológica ou profilaticamente efetiva de cerca de 10 µg a 100 µg, e preferivelmente de cerca de 20 µg a 60 µg de VLPs é administrada diretamente em tecido muscular. Injeção subcutânea, introdução intradermal, impressão através da pele, e outros modos de administração tais como liberação intraperitoneal, intravenosa, ou por inalação também são contemplados. Também é contemplado que vacinas de reforço possam ser proporcionadas. Também é vantajosa a administração parenteral, tal como intravenosa, intramuscular, subcutânea ou de outro meio de administração com adjuvantes tal como alumina ou adjuvante de alumínio Merck, concorrentemente com ou subsequente à introdução parenteral da vacina desta invenção.

Todas as publicações aqui mencionadas são incorporadas como referências para o propósito de descrição e de redação das metodologias e dos materiais que podem ser usados em conexão com a presente invenção. Nada aqui é para ser entendido como uma admissão de que a invenção não é designada para preceder tal descrição em virtude da invenção anterior.

Tendo descrito as modalidades preferidas da invenção com referência aos desenhos acompanhantes, é para ser entendido que a invenção não é limitada àquelas modalidades precisas, e que várias mudanças e modificações podem ser aqui efetuadas por uma pessoa experiente na técnica sem se desviarem do escopo ou do espírito da invenção como definido nas

reivindicações apendidas.

Os seguintes exemplos ilustram, mas não limitam a invenção.

EXEMPLO 1

Determinação de uma Sequência de HPV45 L1 Representativa

- 5 A sequência HPV45 L1 tem sido descrita previamente ((Número de Acesso no GenBank: NC_001590; veja também Delius e Hofman, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186: 13-31 (1994)). Contudo não é incomum encontrar variações de sequência menores entre os DNAs obtidos de isolados clínicos. Para determinar uma sequência de tipo selvagem de HPV45 L1 representativa, DNA foi isolado de quatro amostras clínicas, que como previamente mostrado, contêm HPV 45 DNA. As sequências de HPV 45 L1 foram amplificadas em uma reação em cadeia de polimerase (PCR) usando Tag DNA polimerase e os seguintes iniciadores: HPV 45 L1 F 5'-CCACCACCACCTATATAGGTATTC-3' (SEQ ID NO:4) e HPV 45 L1 B 5'-CAAACATACAT AT ATGTGCTAACA- 3' (SEQ ID NO:5). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese sobre gel de agarose e visualizados por coloração por brometo de etídio. As bandas de L1 de ~1500 pb foram excisadas e o DNA foi purificado usando o kit de purificação QIA quick PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha). O DNA foi então ligado em um vetor de clonagem TA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), *E. Coli* foi transformada com a mistura de ligação e plaqueada sobre ágar LB com ampicilina mais IPTG e X-gal para seleção de colônias azuis/brancas. As placas foram invertidas e incubadas por 16 horas a 37°C.

- 25 PCR de colônias foi realizada sobre oito colônias bancas originárias de cada um dos quatro isolados clínicos que haviam sido amplificados por PCR. HPV 45 L1 DNA foi amplificado por PCR usando iniciadores HPV 45 L1 F e HPV 45 L1 B. O protocolo de PCR específico consistiu de 25 ciclos de 15 segundos a 98°C (desnaturação), 30 segundos a 50°C (anelamento) e 2 minutos a 68°C (extensão). Produtos de PCR foram

visualizados por coloração por brometo de etídio após eletroforese em gel de agarose. Várias colônias de cada isolado continha bandas de L1. A segunda colônia de cada isolado foi cultivada em meio LB com ampicilina, agitando a 37°C por 16 horas. Minipreparados foram realizados para extrair DNA plasmídeo das colônias.

Sequenciamento de DNA foi conduzido sobre os plasmídeos contendo o HPV 45 L1 DNA amplificado e clonado dos quatro isolados clínicos. As seqüências de DNA e de aminoácidos traduzida foram comparadas entre si e com as seqüências Genbank HPV 45 L1. Análise de seqüência dos quatro isolados clínicos revelou que nenhuma seqüência foi idêntica à seqüência de Genbank. O plasmídeo HPV 45 L1 do isolado #33 foi escolhido para ser a seqüência de tipo selvagem (wt) 45 L1 representativa e é aqui referida como a "seqüência de tipo selvagem 45 L1" (SEQ ID NO:3, veja a FIGURA 1). Esta seqüência continha uma deleção de nove nucleotídeos, três aminoácidos, que manteve a matriz de leitura da seqüência subsequente, mutações de cinco pontos resultando em mudanças de cinco aminoácidos e oito mutações de ponto silenciosas adicionais. Aminoácidos 495-497 na seqüência de Genbank estão deletados na 45 L1 wt. Aminoácidos de números 23 (S→N), 55 (N→S), 303 (I→T), 357 (S→N), e 356 (Q→H) representam as cinco mudanças de aminoácido (Genbank aa → 45 L1 wt aa). As 8 mutações silenciosas estavam distribuídas em toda a seqüência 8. Veja a FIGURA 1.

A seqüência de tipo selvagem 45 L1 foi amplificada usando os iniciadores LS-112 5'-CTCAGATCTACAAAACAAAATGGCTTTGTGGCGGCCTAGTGAC-3' (SEQ ID NO:6) e HPV45 L1 EAS 5'-GACAGATCTTATTTTACTACGTATACGTACACG-3' (SEQ ID NO:7) para adicionar extensões *Bgl*II. PCR foi realizada usando Vent polimerase. O produto da PCR foi visualizado por coloração por brometo de etídio de um gel de agarose. A banda de ~1500 pb foi excisada e o DNA foi purificado usando o kit de extração em gel QIAEX II (Qiagen). O produto da PCR foi

então digerido com *Bgl*III a 37°C por 2 horas e purificado usando o kit de purificação QIA quick PCR. O produto de PCR HPV45 L1 digerido por *Bgl*III foi ligado em pGAL110 digerido por *Bam*HI (descrito em Hofmann *et al.*, *Virology* 209: 506-18 (1995)) e *E. coli* DH5 foi transformado com a mistura de ligação.

Colônias foram triadas por PCR para o inserto HPV45 L1 na orientação correta. Sequência e orientação foram confirmadas por sequenciamento de DNA. O clone selecionado foi chamado de PGAL110-HPV 45 L1 #6. Este clone foi digerido com *Pst*I, *Eco*RI, e *Hind*III para determinar o perfil de fragmentos de restrição do gene HPV45 L1 dentro do vetor pGAL110. Os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese sobre geles de agarose. O perfil de fragmentos de restrição resultantes foi visualizado por cloração por brometo de etídio e visto por luz UV.

DNA maxiprep foi preparado. Células de *Saccharomyces cerevisiae* foram tornadas competentes por sua transformação em esferoplasto com Glusalase e transformadas com pGAL110-HPV 45 L1 #6. A mistura de transformação de levedura foi plaqueada em ágar de topo de sorbitol Leu(-) sobre placas de sorbitol (Leu-) e incubada invertida por 5-7 dias a 30°C. As colônias foram coletadas e espalhadas para isolamento clonal sobre placas de sorbitol Leu(-). As colônias foram subsequenteiramente crescidas em 5 mL de 5 X Sorbitol Leu(-) Ade(-) com 1,6% de glicose e 4% de galactose em culturas de tubo rotativo a 30°C para induzir a transcrição de L1 e a expressão de proteína.

EXEMPLO 2

Otimização de códon de levedura

Códons preferidos de levedura têm sido descritos (Sharp, Paul M. e Cowe, Elizabeth 191 Synonymous Códon Usage in *Saccharomyces cerevisiae* YEAST 7: 657-678). Expressão da proteína HPV45 L1 wt foi detectável; entretanto, para obter a expressão aumentada necessária para

desenvolvimento de produto comercial, o gene HPV45 L1 foi reconstruído utilizando códons preferidos de levedura. A citada sequência reconstruída proporcionará expressão de HPV45 aumentada, que será um avanço significativo sobre o tipo selvagem para uso em desenvolvimento de vacina.

- 5 Quando a sequência foi construída usando sequências de códon otimizadas de levedura, a sequência de nucleotídeos de 45 L1 wt foi alterada em 392 posições para produzir 45 L1 R (R = reconstruída). A sequência de aminoácidos, contudo, não foi alterada. As sequências de nucleotídeos (SEQ ID NO: 1) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de HPV45 L1 R são mostradas na FIGURA 2.

- 10 A estratégia empregada para a reconstrução de gene foi planejar oligômeros de anti-senso e de senso de recobrimento longo que abarcam o gene, substituir nucleotídeos por sequências de códon preferidas de levedura ao mesmo tempo mantendo a sequência de aminoácidos original.
- 15 Estes oligômeros foram utilizados no lugar de DNA modelo em uma reação PCR. Iniciadores de amplificação adicionais foram planejados e usados para amplificar as sequências reconstruídas dos oligômeros modelo. *Pfu* DNA polimerase foi utilizada na PCR de 25 ciclos.

- 20 As condições ótimas para amplificação foram seção-específicas, contudo a maioria empregou um programa parecendo-se com 94°C por 5 minutos (desnaturação) seguida por 25 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55-50°C por 30 segundos (anelamento), e 72°C por 1,5 minutos (extensão), seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72°C e manutenção a 4°C. Os produtos de PCR foram examinados por eletroforese
- 25 em gel de agarose. Bandas de tamanho apropriado foram excisadas e o DNA foi purificado em gel. Os fragmentos excisados foram então usados como modelo para montar o gene 1533 nt rebuilt HPV 45 L1.

Após a reconstrução, a banda 1533 nt foi purificada por gel, ligada em pCR4 Blunt (Invitrogen) e células *E. coli* TOP10 foram

transformadas com a mistura de ligação. Colônias foram crescidas em 4 mL de LB com ampicilina e DNA plasmídeo foi extraído por técnicas de minipreparação padrão. O DNA plasmídeo foi seqüenciado para confirmar a presença de mudanças desejadas para o reconstruído 45 L1. O 45 L1 R (reconstruído) foi reamplificado de pCR4Blunt-45 L1 R para adicionar extensões *Bam*HI em ambas as extremidades mais uma seqüência líder 5'-não-traduzida de levedura a montante do códon de iniciação ATG. O fragmento amplificado foi clonado como acima e o DNA plasmídeo foi seqüenciado. O plasmídeo, pCR4 Blunt-45L1 R (Bam), foi digerido com *Bam*HI e os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese sobre um gel de agarose. O fragmento de 45 L1 R (Bam) de ~1550 pb foi purificado por gel, ligado em pGAL110 digerido com *Bam*HI e transformado em TOP10F' *E. coli* (Invitrogen).

Colônias foram triadas por PCR para o inserto HPV45 L1 R na orientação correta em pGAL110. Seqüência e orientação foram confirmadas por seqüenciamento de DNA. DNA plasmídeo maxiprep foi preparado e usado para a transformação de células de *S. cerevisiae* que haviam sido tornadas competentes por sua transformação em esferoplasto. As leveduras transformadas foram plaqueadas em ágar de topo de sorbitol Leu(-) sobre placas de sorbitol (Leu-), que foram incubadas invertidas por 7 dias. As colônias foram espalhadas para isolamento clonal sobre placas de sorbitol Leu(-). As colônias foram subseqüentemente crescidas em 5 mL de 5 X Sorbitol Leu(-) Ade(-) com 1,6% de glicose e 4% de galactose em culturas de tubo rotativo a 30°C para induzir a transcrição de L1 e a expressão de proteína. Após 48 horas de cultura, um volume de cultura equivalente a uma OD₆₀₀ = 10 foi pelletizado, o sobrenadante foi removido e as pelotas foram congeladas e armazenadas a -70°C.

EXEMPLO 3

Preparação de RNA

EXEMPLO 4

Análise de Northern blot

O RNA foi transferido para uma membrana de náilon Hybond-N+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por ação capilar durante 16 horas em 10 x SSC. O RNA foi então fixado na membrana de náilon por reticulação usando função de auto-reticulação de Stratagene UV-Stratalinker

(Stratagene, La Jolla, CA). Após fixação, a membrana de náilon foi permitida secar em ar.

- O Roche DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Suíça) foi usado para marcar seqüências de 45 L1 R DNA com DIG a serem usadas como uma sonda para detectar 45 L R1 RNA sobre Northern blot. A pré-hibridização, a hibridização, e o desenvolvimento imunológico usando um anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina foram realizados segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, o blot foi pré-hibridizado a 37°C por 30 minutos com agitação suave. A sonda foi desnaturada por aquecimento a 95°C por 5 minutos e a reação foi interrompida sobre gelo. A sonda foi adicionada na solução de hibridização e aplicada na membrana por 4 horas a 44,6°C com agitação suave. A solução de hibridização foi então removida e o blot foi lavado duas vezes por 5 minutos em 2 x SSC com 0,1% SDS na temperatura ambiente, seguido por uma lavagem adicional a 65°C com 0,5 x SSC e 0,1% SDS. O blot foi então bloqueado por 30 minutos e anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina foi aplicado em uma diluição de 1:5000 por 30 minutos. O blot foi lavado e a presença de RNA ligado em sonda foi determinada por detecção de substrato NBT/BCIP do anticorpo anti-DIG ligado conjugado com fosfatase alcalina.

- Análise inicial de levedura expressando 45 L1 wt sugeriu que houve transcrição e tradução de HPV45 L1 funcional; contudo, a seqüência foi reconstruída com seqüências de códon preferidas de levedura para obter um nível de expressão aumentado, útil para o desenvolvimento de vacina. A seqüência 45 L1 reconstruída foi engenhada para omitir quaisquer sítios de terminação de transcrição prematuros possíveis para garantir a transcrição robusta. Análise de Northern blot do transcrito 45 L1 R revelou que foram gerados transcritos de comprimento total (FIGURA 3).

EXEMPLO 5

Expressão de proteína HPV45 L1

Pelotas de células de leveduras congeladas de culturas induzidas por galactose equivalentes à $OD_{600} = 10$, foram descongeladas sobre gelo e suspensas em 300 μ L de tampão PC (Na_2HPO_4 100 mM e NaCl 0,5 M, pH 7,0) com PMSF 2 mM. Glóbulos de vidro de 0,5 mm lavados com ácido, foram adicionados, ~0,5 g/tubo. Os tubos foram agitados por 3 ciclos de 5 minutos a 4°C com um repouso de 1 minuto. 7,5 μ L de Triton X100 20% foram adicionados e a agitação foi repetida por 5 minutos a 4°C. Os tubos foram deixados sobre gelo por 15 minutos, e então centrifugados por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga estéril, rotulado como extrato de proteína de levedura total, datado e armazenado a -70°C.

EXEMPLO 6

Análise de Western blot

Extratos de proteína de levedura total de vinte colônias de levedura isoladas para cerca de construto de 45 L1 foram analisados por Western blot para confirmar a expressão de proteína 45 L1 após indução por galactose.

Dez microgramas de extrato de proteína de levedura total foram combinados com tampão de carregamento de SDS-PAGE e aquecidos a 95°C por 10 minutos. As proteínas foram carregadas para cima de um gel de 10% SDS-PAGE e submetidas à eletroforese em tampão Tris-Glicina. Após a separação das proteínas, as proteínas foram transferidas para Western do gel para nitrocelulose e o blot foi bloqueado em 1 x tampão diluente (Kirkegaard and Perry Laboratories) por 1 hora na temperatura ambiente com movimentação oscilante. O blot foi lavado três vezes e então incubado com uma diluição de 1:2500 de soro de cabra anti-trpE-HPV 45 L1 na temperatura ambiente por 16 horas. O blot foi lavado três vezes e incubado com uma diluição de 1:25000 de anticorpo anti-cabra conjugado com HRP por 1 h. O

blot foi novamente lavado três vezes e o substrato de detecção NBT/BCIP foi aplicado (Kirkegaard and Perry Laboratories). Proteínas imunorreativas foram detectadas como bandas púrpuras sobre o blot.

Os resultados demonstram que em todos os casos, a proteína 45 L1 foi detectada como uma banda imunorreativa distinta sobre nitrocelulose correspondendo a aproximadamente 57 kDa (FIGURA 4). A proteína 16 L1, que é aproximadamente de 55 kDa, foi incluída como um controle positivo, juntamente com extrato de proteína de levedura total livre de HPV L1 como um controle negativo (dados não mostrados).

EXEMPLO 7

Ensaio ELISA

As células de levedura expressando HPV 45 L1 foram crescidas por uma variedade de métodos incluindo culturas em tubo rotativo, frascos agitados e fermentadores. As leveduras foram lisadas e os extratos de proteína foram preparados para determinar a quantidade de partículas semelhantes a vírus HPV 45 L1 (VLPs) produzidas por micrograma de proteína total. Um ELISA de sanduíche foi planejado para demonstrar a expressão de HPV 45 L1 VLP.

O anticorpo monoclonal H18R.5 (mAb), que reconhece ambos os tipos de HPV 18 e 45 L1 VLPs, foi usado para ligar as 45 L1 VLPs encontradas em extratos de proteína de levedura. As proteínas não ligadas foram removidas por lavagem e H45.10B11.5A5, um tipo de HPV 45 L1 VLP e mAB específico conformacional, foi aplicado como um anticorpo de detecção. 45 L1 VLPs verdadeiros, conformacionalmente corretos foram ligados e a detecção foi facilitada pelo uso de um anticorpo IgG1 anti-camundongo conjugado com HRP e substrato TMB.

Especificamente, H18R.5 foi usado para revestir o fundo de placas de 96 cavidades Immulon 4 HBX durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS e 0,05% Tween 20, seguido por bloqueio

- com solução de bloqueio (PBS + 0,05% Tween 20 + 1% BSA). As placas foram lavadas três vezes e antígenos (lisados de célula total diluídos em solução de bloqueio para 100 µg/mL), foram aplicados na fila A em duplicata. Padrões de referência de HPV 45 L1 VLPs purificadas foram aplicados nas
- 5 - colunas 1 e 2 da fila A a 3300 ng/mL em 100 µg/mL de proteína de levedura total. As amostras de referência e de teste foram então serialmente diluídas duas vezes descendentemente em cada coluna. Após 3 horas na temperatura ambiente o antígeno em excesso foi removido por aspiração e as placas foram lavadas 3 vezes. Sobrenadante celular contendo HPV 45 L1 VLP
- 10 - conformacional específico mAb H45.10B11.A5 foi diluído 1:80 em solução de bloqueio e aplicado em cada cavidade por uma hora na temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes e um anticorpo IgG1 anti-camundongo conjugado com HRP diluído 1:8000 em solução de bloqueio foi aplicado por 1 hora na temperatura ambiente. As placas foram lavadas e TMB
- 15 - (Pierce) foi aplicado por 5 minutos para detectar complexos de anticorpo conjugado com HRP. A reação de detecção foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2 M. As placas foram lidas em comprimento de onda de 450 nm e a concentração de HPV 45 L1 VLP foi determinada por comparação com os padrões de referência em ng de VLP/ µg de proteína total.

- 20 - Uma comparação entre 45 L1 wt e dois clones separados de 45 L1 R, todos ensaiados em duplicatas, é mostrada na FIGURA 5. Expressão de HPV45 L1 VLP reconstruída foi aproximadamente 2 vezes maior do que a dos resultados observados para 45 L1 wt (FIGURA 6)

EXEMPLO 8

- 25 - Microscopia eletrônica de transmissão

Para demonstrar que a proteína 45 L1 foi de fato auto-montagem para formar capsômeros L1-pentaméricos, que por sua vez se auto-montam em partículas semelhantes a vírus, um extrato de proteína 45 L1 R parcialmente purificado foi analisado por EM de transmissão.

Células de levedura foram crescidas sob condições de fermentação em escala pequena, pelotizadas e as pelotas foram submetidas aos tratamentos de purificação. A pelota e os extratos de levedura clarificados foram analisados por imunoblot para demonstrar a expressão de proteína L1 e a retenção por meio do procedimento de purificação. Extratos de levedura clarificados foram então submetidos à centrifugação sobre uma camada de sacarose a 45% e a pelota resultante foi suspensa em tampão para análise por microscopia eletrônica de varredura (EM).

Uma amostra representativa das 45 L1 VLPs produzidas é mostrada na FIGURA 6. O diâmetro das partículas periféricas nesta amostra bruta variou de entre 40 nm e 60 nm com algumas partículas exibindo um arranjo de capsômeros regular.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico **caracterizada** pelo fato de que consiste em uma sequência de nucleotídeos como definida na SEQ ID NO: 1.

2. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico definida na reivindicação 1.

3. Célula de levedura **caracterizada** pelo fato de que compreende o vetor definido na reivindicação 2.

4. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de ser selecionada do grupo consistindo em *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Schizosaccharomyces pombe*.

5. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de ser *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Partícula semelhante a vírus (VLP) **caracterizada** pelo fato de que compreende a proteína L1 recombinante de HPV45, em que a proteína L1 recombinante é produzida em levedura e consiste em uma sequência de aminoácidos como definida na SEQ ID NO: 2.

7. Partícula semelhante a vírus, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que a proteína L1 recombinante é codificada por uma molécula de ácido nucleico códon otimizada para L1 de HPV45.

8. Partícula semelhante a vírus, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucleico códon otimizada consiste essencialmente em uma sequência de nucleotídeos como definida na SEQ ID NO: 1.

9. Método para produzir uma partícula semelhante a vírus (VLP) de HPV45 **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) transformar levedura com uma molécula de DNA códon otimizada

codificadora de proteína L1 de HPV45, definida na reivindicação 1;

(b) cultivar a levedura transformada sob condições que permitem a expressão da molécula de DNA códon otimizada para produzir uma proteína de papilomavirus recombinante; e

(c) isolar a proteína de papilomavirus recombinante para produzir a VLP de HPV45.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a levedura é selecionada do grupo consistindo em *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Schizosaccharomyces pombe*.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a levedura é *Saccharomyces cerevisiae*.

Alinhamento de sequência de nucleotídeos de HPV 45 L1

45 L1 wt	(1)	ATGGCTTTGTGGCGGCCTAGTGACAGTACGGTATATCTTCCACCACCTTC
45 L1 R	(1)	A.A..ATC....TC...T..C..CT.G.....A..
45 L1 wt	(51)	TGTGGCCAGAGTTGTCAACACTGATGATTATGTGTCTCGCACAAGCATAT
45 L1 R	(51)	...C..T.....C.....C..C..C..CA.A..CTC...C.
45 L1 wt	(101)	TTTACCATGCAGGCAGTTCCCGATTATTAAGTGTAGGCAATCCATATTTT
45 L1 R	(101)	.C.....C..T..TTC....A....G..G.....C..T..C.....C..C
45 L1 wt	(151)	AGGGTTGTACCTAGTGGTGCAGGTAATAAACAGGCTGTTCTAAGGTATC
45 L1 R	(151)	..A..C..C..ATCC....T.....C..G..A.....A.....C..
45 L1 wt	(201)	CGCATATCAGTATAGGGTGTTTAGAGTAGCTTTGCCCGATCCTAATAAAT
45 L1 R	(201)	T..T..C..A..C..A..C..C.....C.....A..C..A..C..G.
45 L1 wt	(251)	TTGGATTACCTGATTCTACTATATATAATCCTGAAACACAACGTTTGGTT
45 L1 R	(251)	.C..T..G..A..C.....C..C..C..A....T...A.A.....C
45 L1 wt	(301)	TGGGCATGTGTAGGTATGGAATTGGTCGTGGGCAGCCTTTAGGTATTGG
45 L1 R	(301)	C..C.....C...A.A..T..A..A..G.....C..
45 L1 wt	(351)	CCTAAGTGGCCATCCATTTTATAATAAATTGGATGATACAGAAAGTGCTC
45 L1 R	(351)	TT.GTC...T..C.....C..C..C..G.....C..C..C...TCC....
45 L1 wt	(401)	ATGCAGCTACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTCAGTT
45 L1 R	(401)	.C..T.....T.....C..C..T..A..C..C..A..C..C..C..T..C
45 L1 wt	(451)	GATTATAAGCAAAACACAGCTGTGTATTTTAGGTTGTGTACCTGCTATTGG
45 L1 R	(451)	..C..C.....C..AT.....C..G.....C..A.....C..
45 L1 wt	(501)	TGAGCACTGGGCCAAGGGCACACTTTGTAAACCTGCACAATTGCAACCTG
45 L1 R	(501)	...A.....T....T..CT.G.....G..A..T.....A.
45 L1 wt	(551)	GTGACTGTCCTCCTTTGGAACCTAAAAACACCATTATTGAGGATGGTGAT
45 L1 R	(551)	A..A.....T.G..G.....T..C..C..A..C.....C

FIG. 1A

45 L1 wt	(601)	ATGGTGGATACAGGTTATGGGGCAATGGATTTTAGTACATTGCAGGATAC
45 L1 R	(601)	T..C..T.....C..T..T.....C..CTCC..CC.....C..
45 L1 wt	(651)	AAAGTGCAGGTTCCATTAGACATTTGTCAATCCATCTGTAAATATCCAG
45 L1 R	(651)	T.....T..A.....G.....C.....T.....G..C....
45 L1 wt	(701)	ATTATTTGCAAATGTCTGCTGATCCCTATGGGGATTCTATGTTTTTTTGC
45 L1 R	(701)	.C..C.....C.....C..A..C..T..C.....C..C..T
45 L1 wt	(751)	CTACGCCGTGAACAACTGTTTGCAAGACATTTTGAATAGGGCAGGTGT
45 L1 R	(751)	T.GA.AA.A.....T....C..T....C..C.....C..A..T....
45 L1 wt	(801)	TATGGGTGACACAGTACCTACAGACCTATATATTAAAGGCACCTAGCGCTA
45 L1 R	(801)	C.....T..T..A..T...T.G..C..C..G..T..CTCT....
45 L1 wt	(851)	ATATGCGTGAAACCCCTGGCAGTTGTGTGATTCCCTTCTCCCAGTGGC
45 L1 R	(851)	.C...A.A....T..A..TTCC.....C..C..T..A.....ATC...T
45 L1 wt	(901)	TCTATTACTACTTCTGATTCTCAATTATTTAATAAGCCATATTGGTTACA
45 L1 R	(901)	C.....C..C.....G..C..C.....C.....G..
45 L1 wt	(951)	TAAGGCCCAGGGCCATAACAATGGTATTTGTTGGCATAATCAGTTGTTTG
45 L1 R	(951)	C.....T..A..T..C.....C.....C.....C..C..A.....C..
45 L1 wt	(1001)	TTACTGTAGTGGACACTACCCGCAGTACTAATTTAACATTATGTGCCTCT
45 L1 R	(1001)	.C..C..C..T.....A.ATC.....C..G..C..G.....T...
45 L1 wt	(1051)	ACACAAAATCCTGTGCCAAATACATATGATCCTACTAAGTTTAAGCACTA
45 L1 R	(1051)	..T.....C..A..T.....C..T..C..C..A..C.....C.....
45 L1 wt	(1101)	TAGTAGACATGTGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAGTTGTGCA
45 L1 R	(1101)	CTCC.....C..C.....C..C..G..A..C..C..C..A.....T..
45 L1 wt	(1151)	CTATTACTTTAACTGCAGAGGTTATGTCATATATCCATAGTATGAATAGT
45 L1 R	(1151)	C..C..G..C..T..A..C.....C..C..T..CTC.....CTCC
45 L1 wt	(1201)	AGTATATTGAAAAATTGGAATTTTGGTGTACCTCCACCACCTACTACAAG
45 L1 R	(1201)	TC...C.....C.....C..C.....T..A.....A..C..CTC

FIG.1B

45 L1 wt	(1251)	TTTAGTGGATACATATCGTTTTGTGCAATCAGTTGCTGTTACCTGTCAAA
45 L1 R	(1251)	C..G..T..C..T..CA.A..C..C.....T..C.....C..T.....
45 L1 wt	(1301)	AGGATACTACACCTCCAGAAAAGCAGGATCCATATGATAAAATTAAAGTTT
45 L1 R	(1301)	C..C..T..A.....A..C.....C..C..G..G.....C
45 L1 wt	(1351)	TGGACTGTTGACCTAAAGGAAAAATTTCTCCGATTTGGATCAATATCC
45 L1 R	(1351)	T.G.....G..C..T.....C.....C.....C..
45 L1 wt	(1401)	CCTTGGTGAAAGTTTTTAGTTTCAGGCTGGGTTACGTCGTAGGCCTACCA
45 L1 R	(1401)	AT.G...A.....C..G....A.....T..GA.A....A..A..T.
45 L1 wt	(1451)	TAGGACCTCGTAAGCGTCCTGCTGCTTCCACGTCTACTGCATCTAGGCCT
45 L1 R	(1451)	.C..T..A.....A..A.....T..C.....T.....A..A
45 L1 wt	(1501)	GCCAAACGTGTACGTATACGTAGTAAAAAATAA (SEQ ID NO:3)
45 L1 R	(1501)	..T..G.....CA.A..CA.ATCC..G..G...(SEQ ID NO:1)

FIG.1C

Sequências de aminoácidos e de nucleotídeos de HPV 45 L1 sintéticas

M A L W R P S D S T V Y L P P P S
 1 ATGGCTTTGT GGAGACCATC TGACTCTACT GTCTACTTGC CACCACCATC
 TACCGAAACA CCTCTGGTAG ACTGAGATGA CAGATGAACG GTGGTGGTAG
 V A R V V N T D D Y V S R T S I F
 51 TGTGCTAGA GTCGTCAACA CTGACGACTA CGTCTCCAGA ACCTCCATCT
 ACAGCGATCT CAGCAGTTGT GACTGCTGAT GCAGAGGTCT TGGAGGTAGA
 Y H A G S S R L L T V G N P Y F
 101 TCTACCACGC TGGTCTTCC AGATTGTTGA CTGTCGGTAA CCCATACTTC
 AGATGGTGCG ACCAAGAAGG TCTAACAAC GACAGCCATT GGGTATGAAG
 R V V P S G A G N K Q A V P K V S
 151 AGAGTCGTCC CATCCGGTGC TGGTAACAAG CAAGCTGTTT CAAAGGTCTC
 TCTCAGCAGG GTAGGCCACG ACCATTGTTT GTTCGACAAG GTTTCAGAG
 A Y Q Y R V F R V A L P D P N K F
 201 TGCTTACCAA TACAGAGTCT TCAGAGTCGC TTTGCCAGAC CCAAACAAGT
 ACGAATGGTT ATGTCTCAGA AGTCTCAGCG AAACGGTCTG GGTGTTGTCA
 G L P D S T I Y N P E T Q R L V
 251 TCGGTTTGCC AGACTCTACT ATCTACAACC CAGAACTCA AAGATTGGTC
 AGCCAAACGG TCTGAGATGA TAGATGTTGG GTCITTTAGT TTCTAACCAG
 W A C V G M E I G R G Q P L G I G
 301 TGGGCATGCG TCGGTATGGA AATCGGTAGA GGTCAACCAT TGGGTATCGG
 ACCCGTACGC AGCCATACCT TTAGCCATCT CCAGTTGGTA ACCCATAGCC
 L S G H P F Y N K L D D T E S A H
 351 TTTGTCTGGT CACCCATTCT ACAACAAGT GGACGACACC GAATCCGCTC
 AAACAGACCA GTGGGTAAGA TGTGTTCAA CCTGCTGTGG CTTAGGCGAG
 A A T A V I T Q D V R D N V S V
 401 ACGCTGTAC TGCTGTCATC ACTCAAGAGC TCAGAGACAA CGTCTCTGTC
 TGCGACGATG ACGACAGTAG TGAGTTCTGC AGTCTCTGTT GCAGAGACAG
 D Y K Q T Q L C I L G C V P A I G
 451 GACTACAAGC AAACCAATT GTGTATCTTG GGTGTGTGCC CAGCTATCGG
 CTGATGTTTG TTTGGGTTAA CACATAGAAC CCAACACAGG GTCGATAGCC
 E H W A K G T L C K P A Q L Q P G
 501 TGAACACTGG GCTAAGGGTA CCTTGTGTAA GCCAGCTCAA TTGCAACCAG
 ACTTGTGACC CGATTCCCAT GGAACACATT CGGTCGAGTT AACGTTGGTC

FIG.2A

D C P P L E L K N T I I E D G D
551 GTGACTGTCC ACCATTGGAA TTGAAGAACA CTATCATCGA AGACGGTGAC
CACTGACAGG TGGTAACCTT AACTTCTTGT GATAGTAGCT TCTGCCACTG
M V D T G Y G A M D F S T L Q D T
601 ATGGTTGACA CTGGTTACGG TGCTATGGAC TTCTCCACCC TGCAGGACAC
TACCAACTGT GACCAATGCC ACGATACCTG AAGAGGTGGG ACGTCCTGTG
K C E V P L D I C Q S I C K Y P D
651 TAAGTGTGAA GTTCCATTGG ACATCTGTCA ATCTATCTGT AAGTACCCAG
ATTCACACTT CAAGGTAACC TGTAGACAGT TAGATAGACA TTCATGGGTC
Y L Q M S A D P Y G D S M F F C
701 ACTACTTGCA AATGTCCGCT GACCCATACG GTGACTCTAT GTTCTTCTGT
TGATGAACGT TTACAGGCCA CTGGGTATGC CACTGAGATA CAAGAAGACA
L R R E Q L F A R H F W N R A G V
751 TTGAGAAGAG AACAATTGTT CGCTAGACAC TTCTGGAACA GAGCTGGTGT
AACTCTTCTC TTGTTAACA GCGATCTGTG AAGACCTTGT CTCGACCACA
M G D T V P T D L Y I K G T S A N
801 CATGGGTGAC ACTGTTCCAA CTGACTTGTA CATCAAGGGT ACCTCTGCTA
GTACCCACTG TGACAAGGTT GACTGAACAT GTAGTTCCCA TGGAGACGAT
M R E T P G S C V Y S P S P S G
851 ACATGAGAGA AACTCCAGGT TCCTGTGTCT ACTCTCCATC TCCATCTGGT
TGTACTCTCT TTGAGGTCCA AGGACACAGA TGAGAGGTAG AGGTAGACCA
S I T T S D S Q L F N K P Y W L H
901 TCTATCACTA CTTCCGACTC TCAATTGTTT AACAAAGCAT ACTGGTTGCA
AGATAGTGAT GAAGGCTGAG AGTTAACAAG TTGTTGCGTA TGACCAACGT
K A Q G H N N G I C W H N Q L F V
951 CAAGGCTCAA GGTCAACAACA ACGGTATCTG TTGGCACAAC CAATTGTTCTG
GTTCCGAGTT CCAAGTGTGT TGCCATAGAC AACCGTGTG GTTAACAAGC
T V V D T T R S T N L T L C A S
1001 TCACCGTCGT TGACACTACC AGATCTACTA ACTTGACCTT GTGTGCTTCT
AGTGCGAGCA ACTGTGATGG TCTAGATGAT TGAAGTGAA CACACGAAGA
T Q N P V P N T Y D P T K F K H Y
1051 ACTCAAAACC CAGTTCCAAA CACTTACGAC CCAACCAAGT TCAAGCACTA
TGAGTTTGG GTCAAGGTTT GTGAATGCTG GGTGGTTCA AGTTCGTGAT
S R H V E E Y D L Q F I F Q L C T
1101 CTCCAGACAC GTCGAGGAAT ACGACTTGCA ATTCATCTTC CAATTGTGTA
GAGGTCTGTG CAGCTCCTTA TGCTGAACGT TAAGTAGAAG GTTAACACAT
I T L T A E V M S Y I H S M N S
1151 CTATCACCTT GACCGCTGAA GTCATGTCCT ACATTCACCTC TATGAACTCC
GATAGTGAA CTGGCGACTT CAGTACAGGA TGTAAGTGAG ATACTTGAGG

FIG.2B

S I L E N W N F G V P P P P T T S
1201 TCTATCTTGG AAAACTGGAA CTTCGGTGTT CCACCACCAC CAACCACCTC
AGATAGAACC TTTTGACCTT GAAGCCACAA GGTGGTGGTG GTTGGTGGAG
L V D T Y R F V Q S V A V T C Q K
1251 CTTGGTTGAC ACTTACAGAT TCGTCCAATC TGTCGCTGTC ACTTGTCAAA
GAACCAACTG TGAATGTCTA AGCAGGTTAG ACAGCGACAG TGAACAGTTT
D T T P P E K Q D P Y D K L K F
1301 AGGACACCAC TCCACCAGAA AAGCAAGACC CATAAGACAA GTTGAAGTTC
TCCTGTGGTG AGGTGGTCTT TTCGTTCTGG GTATGCTGTT CAACTTCAAG
W T V D L K E K F S S D L D Q Y P
1351 TGGACTGTTG ACTTGAAGGA AAAGTTCTCT TCCGACTTGG ACCAATACCC
ACCTGACAAC TGAACCTCCT TTTCAAGAGA AGGCTGAACC TGGTTATGGG
L G R K F L V Q A G L R R R P T I
1401 ATTGGGTAGA AAGTTCTTGG TTCAAGCTGG TTTGAGACGT AGACCAACTA
TAACCCATCT TTCAAGAACC AAGTTCGACC AAACCTGCA TCTGGTTGAT
G P R K R P A A S T S T A S R P
1451 TCGGTCCACG TAAGAGACCA GCTGCTTCCA CTTCCACTGC TTCTAGACCA
AGCCAGGTGC ATTCTCTGGT CGACGAAGGT GAAGGTGACG AAGATCTGGT
A K R V R I R S K K * (SEQ ID NO:2)
1501 GCTAAGCGTG TCAGAATCAG ATCCAAGAAG TAA (SEQ ID NO:1)
CGATTGCAC AGTCTTAGTC TAGGTTCTTC ATT (SEQ ID NO:8)

FIG.2C

ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DE HPV45 L1 R

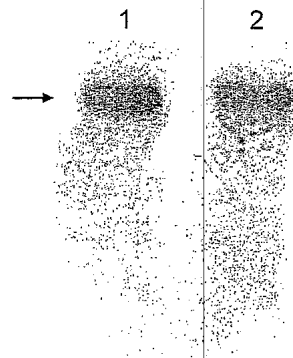


FIG.3

WESTERN BLOT DE HPV 45 L1 wt E
DE ISOLADOS DE HPV 45 L1

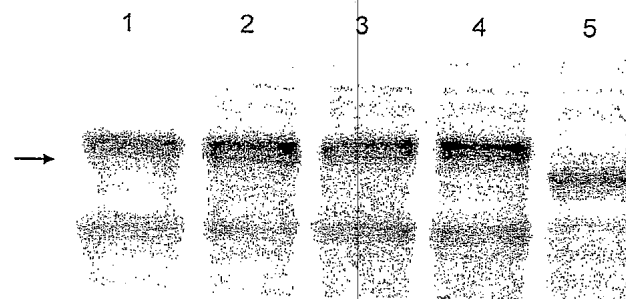


FIG.4

ENSAIO ELISA

CONSTRUTO L1	ng VLP/mcg PROTEÍNA TOTAL	AUMENTO DE VEZES SOBRE TIPO SELVAGEM
45 L1 DE TIPO SELVAGEM	5 ng VLP/mcg PROTEÍNA TOTAL	não disponível
45 L1 ISOLADO # 4	12 ng VLP/mcg PROTEÍNA TOTAL	2,4
45 L1 R ISOLADO # 11	10 ng VLP/mcg PROTEÍNA TOTAL	2,0

FIG. 5

10/10.

P10414845

Fig

EM DE TRANSMISSÃO DE VLPs COMPOSTAS DE
MOLECULAS DE PROTEINA HPV 45 L1

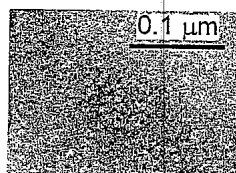


FIG.6