INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1325957 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/37 (2006.01) ***C07K 14/25*** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) ***A61K 39/12*** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1995.05.17**

(30) Prioridade(s): **1994.05.17 AU PM56679**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.07.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.13**
001/2007

(73) Titular(es):
UNIVERSITY OF QUEENSLAND,THE
ST. LUCIA, QLD 4072 **AU**

(72) Inventor(es):
IAN FRAZER **AU**
JIAN ZHOU **US**

(74) Mandatário:
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **L1 RECOMBINANTE DO VÍRUS DO PAPILOMA**

(57) Resumo:

RESUMO

"L1 RECOMBINANTE DO VÍRUS DO PAPILOMA"

Este invento está relacionado com uma proteína L1 recombinante do vírus do papiloma que pode induzir uma resposta imune, a qual reconhece VLP de vírus do papiloma com proteína L1, e pode formar no meio extracelular uma estrutura multimérica ou VLP, em que a estrutura multimérica compreende uma pluralidade de proteínas L1 recombinantes do vírus do papiloma. Este invento também inclui a utilização da proteína L1 recombinante do vírus do papiloma para detectar a presença de vírus do papiloma e pode formar a base de uma vacina para uso profiláctico e terapêutico.

DESCRIÇÃO

"L1 RECOMBINANTE DO VÍRUS DO PAPILOMA"

CAMPO DO INVENTO

Este invento está relacionado com a proteína L1 dos vírus do papiloma. Em particular, o invento está relacionado com a protéina L1 recombinante do vírus do papiloma e sua utilização para a detecção e tratamento de infecções por vírus do papiloma.

FUNDAMENTO DO INVENTO

Os vírus do papiloma infectam uma gama de hospedeiros incluindo o Homem, gado bovino, ovinos, cães e gatos. Para uma listagem mais completa, ver "Papilloma Virus Infections in Animals" de J.P. Sundberg que está descrita em "Papilloma Viruses and Human Diseases", editado por K. Syrjanen, L. Gissman e L.G. Koss, Springer Verlag, 1987.

Os vírus do papiloma induzem lesões hiperproliferativas benignas do epitélio cutâneo e das mucosas. De entre os 70 tipos diferentes de vírus que infectam o Homem, mais de 20 estão associados a lesões anogenitais (de Villiers, 1989, J. Virol. **63** 4898-4903). Os vírus do

papiloma também têm sido associados a várias formas de cancros. Os vírus do papiloma humano tipos 16 e 18 têm sido associados a uma série de neoplasias cervicais intra-epiteliais e carcinomas do cérvix (Lancaster *et al.*, 1987, Cancer Metast. Ver. **6** 6653-6664 e Pfister, 1987, Adv. Cancer Res. **48** 113-147).

Os vírus do papiloma são pequenos vírus de DNA codificadores de até oito genes precoces e dois genes tardios. Os genes tardios L1 e L2 codificam proteínas estruturais que formam uma cápside dentro da célula (Galloway *et al.*, 1989, Adv. Virus Res. **37** 125-171). Uma cápside viral simples é um icosaedro T=7d composto por 360 capsómeros pentaméricos, cada um dos quais contem cinco moléculas da principal proteína da cápside L1 (Baker *et al.*, 1991, Biophys. J. **60** 1445-1456 e Finch *et al.*, 1965, J. Mol. Bio. **13** 1-12). A proteína da cápside L2, menos abundante, está presente num décimo da abundância de L1 (Doorbar *et al.*, 1987, J. Virol. **61** 2793-2799).

A propagação de vírus do papiloma humano *in vitro* não tem sido conseguida (Taichman *et al.*, 1984, J. Invest. Dermatol. **83** 25) e apenas pequenas quantidades de proteínas de HPV foram isoladas a partir de tecidos infectados (Androphy *et al.*, 1987, Embo J. **6** 1989; Banks *et al.*, 1987, J. Gen. Virol. **68** 1351; Firzlaff *et al.*, 1988, Virology **164** 467; Oltersdorf *et al.*, 1987, J. Gen. Virol. **68** 2933; Schneider-Gadicke *et al.*, 1988, Cancer Res. **48** 2969; Seedorf *et al.*, Embo J. **6** 139 e Smotkin *et al.*, 1986, PNAS

83 4680). A proteína L1 de HPV foi isolada a partir de neoplasias cervicais precoces (Crum *et al.*, 1990, Virology **178** 238). O gene codificador da proteína L1 foi clonado e expresso num sistema de expressão eucariótico usando o vírus da vacina recombinante (Browne *et al.*, 1988, J. Gen. Virol. **69** 1263-1273; Zhou *et al.*, 1990, J. Gen. Virol. **71** 2185-2190 e Zhou *et al.*, 1991, Virology **185** 251-257). Mais particularmente, os viriões de papilomavírus bovino foram produzidos *in vitro* usando proteínas L1 e/ou L2 expressas pelo vírus da vacina (Zhou *et al.*, 1993, **74** 763). A expressão foi igualmente demonstrada num sistema de expressão de baculovírus (Park *et al.*, 1993, J. Virol. Meth. **45** 303-318; Rose *et al.*, 1993, J. Virol. **67** 1936; Stauffer *et al.*, 1994, Experientia: 26th Annual Meeting of the Swiss Societies for Experimental Biology 50 A9) e num sistema de expressão bacteriano (Strike *et al.*, J. Gen. Virol. **79** 543-555; Thomson & Roman, 1987, Gene **56** 289; Banks *et al.*, 1987, J. Gen. Virol. 68 3081) e também em bactérias com um parceiro de fusão de hexa-histidina (Stauffer *et al.*, 1994, *supra*). Se bem que fragmentos da proteína L1 de HPV tenham sido produzidos *in vitro* em *E. coli*, os quais são capazes de serem reconhecidos por anticorpos produzidos por doentes infectados por HPV (Snyder *et al.*, 1991, Cancer Res. **51** 4423), nenhum dos sistemas de expressão bacteriano atrás referidos demonstrou montagem de L1 sozinha, ou em conjunto com L2 de HPV, numa estrutura multimérica, como seja um capsómero pentamérico.

Uma vez que a proteína L1 é a principal proteína

da cápside, foi usada como base do desenvolvimento de vacinas para a protecção contra a infecção por vírus do papiloma. Zhou *et al.* imunizou ratinhos com partículas tipo vírus ("VLPs") de HPV 16 usando um vírus da vacina duplamente recombinante para as proteínas L1 e L2 de HPV 16. O anti-soro murino anti-VLP reconheceu cápsides de HPV 16 por ELISA e a proteína L1 e L2 de HPV 16 recombinante produzida em baculovírus em imunotransferências. Os anti-soros de ratinho anti-VLP, no entanto, falharam o reconhecimento de dois peptídeos que foram reconhecidos por anticorpos monoclonais anti-L1 de HPV 16 induzidos contra uma proteína de fusão de L1 recombinante (Zhou *et al.*, 1992, Virology **189** 592-599). Estes investigadores concluíram que os epitopos imuno-reactivos de HPV 16 definidos usando partículas tipo vírus diferem significativamente dos definidos usando proteínas de fusão L1 recombinantes de HPV16.

Para ultrapassar os problemas de apresentação, foram desenvolvidas vacinas usando partículas tipo vírus. As VLPs foram formadas dentro da célula a partir de proteínas L1 ou L1 e L2 recombinantes codificadas pelo vírus da vacina recombinante (Zhou *et al.*, 1991, Virology **185** 251-257; Zhou *et al.*, 1991, Virology **181** 203-210 e Especificação de Patente Internacional WO93/02184). Estas vacinas usando partículas tipo vírus sintéticas possuem uma série de desvantagens. Em primeiro lugar, os genes recombinantes de L1 ou L1 e L2 foram expressos a partir do vector de vírus da vacina que pode não ser adequado para a

produção de uma vacina. Em segundo lugar, as partículas tipo vírus são produzidas dentro da célula o que constitui um passo limitante. Em terceiro lugar, as partículas tipo vírus podem incorporar DNA celular devido a serem produzidas dentro da célula e as partículas tipo vírus que incorporam DNA não são adequadas para usar em vacinas. Em quarto lugar, as partículas tipo vírus podem ser apenas parcialmente purificadas devido à necessidade de reter a sua integridade e portanto apresentação correcta de epitopos. Consequentemente, outras proteínas ou componentes associados às partículas tipo vírus podem contaminar uma preparação de vacinas. Em quinto lugar, o processo da produção de uma vacina em quantidades comerciais com partículas tipo vírus a partir de vírus da vacina recombinantes é comparativamente dispendiosa.

Desvantagens semelhantes são aplicadas à utilização de partículas tipo vírus produzidas a partir de vírus da vacina recombinantes para a detecção de anticorpos no soro de doentes.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento resulta da descoberta surpreendente de que uma proteína L1 recombinante do vírus do papiloma, expressa em bactérias, compreendendo uma sequência de fusão N-terminal que se liga a níquel, pode formar uma estrutura multimérica extracelular.

O invento proporciona assim uma estrutura pentamérica compreendendo uma pluralidade de proteínas L1 de vírus do papiloma em que uma ou mais das referidas proteínas L1 do papiloma é uma proteína de fusão recombinante compreendendo uma sequência de aminoácidos N-terminal capaz de se ligar a níquel e é obtida a partir de uma bactéria em condições desnaturantes.

De preferência, cada uma das referidas proteínas L1 recombinante de vírus do papiloma é uma proteína de fusão recombinante, compreendendo uma sequência de aminoácidos N-terminal capaz de se ligar a níquel, e é obtida a partir de uma bactéria sob condições desnaturantes.

De preferência, cada uma das referidas proteínas L1 recombinantes de vírus do papiloma possui uma sequência de aminoácidos N-terminal compreendendo $(His)_6$.

De preferência, cada uma das proteínas L1 recombinantes do vírus do papiloma compreende uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:4.

Com vantagem, a estrutura pentamérica é capaz de induzir uma resposta imune que reconhece VLP do vírus do papiloma.

O invento ainda proporciona uma vacina profiláctica ou terapêutica compreendendo a referida estrutura pentamérica. A vacina pode ainda compreender um adjuvante,

como seja ISCOMS, alúmen, adjuvante incompleto de Freund, adjuvante completo de Freund, Quil A, outras saponinas, hidróxido de alumínio algamulina e pertussigénio.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1 ilustra a sequência de nucleótidos do DNA e a sequência de aminoácidos da proteína HPV6bL1 HEXAHIS (SEQ ID NO:3) e

FIG. 2 é uma micrografia electrónica das estruturas pentaméricas de agregados de proteína HPV6bL1 HEXAHIS.

Pode-se fazer agora referência a várias realizações preferidas do invento. Nestas realizações preferidas, deve-se notar que as referências a vírus do papiloma específicos, vacinas e construções de moléculas de DNA recombinantes são apresentadas apenas como exemplo.

SECÇÃO EXPERIMENTAL

EXEMPLO 1: Produção da proteína HPV6bL1 HEXAHIS

Construção de pTRC6bL1

A grelha de leitura aberta L1 de HPV6b foi clonada, a partir de um isolado clínico, por reacção em cadeia com polimerase usando como sequências iniciadoras:

GCGGATCCAGATGTGGCGGCCTAGCGACAGCACAGTATATG (SEQ ID NO:5) e CGCCCGGGTTACCTTTTAGTTTTGGCCTCGCTTACGTTTTAG (SEQ ID NO:6)

O produto de PCR resultante de 1,5 Kb foi clivado com *Bam*HI e *Sma*I e clonado num local *Bam*HI/*Eco*RI cerse com Klenow criado dentro do plasmídeo pTRCHIS B (Invitrogen). O plasmídeo recombinante L1 resultante foi pTRC6bL1 e codifica uma sequência proteica (SEQ ID NO:7). Met.Arg.Gly.Ser. His.His.His.His.His.His.Gly.Met.Ala.Ser.Met.Thr.Gly.Gly. Gln.Gln.Met.Gly.Arg.Asp.Leu.Tyr.Asp.Asp.Asp.Lys.Asp. (HPV6b L1 aas 1-520).

Crescimento de bactérias codificadoras da proteína HPV6b L1 HEXAHIS

10 ml de meio líquido 2YT (16 mg de triptona, 10 mg de levedura, 5 mg de NaCl) contendo Ampiclina (concentração final 100 μg/ml) foi inoculado com 10 μl de uma ansada de bactérias (*E. coli* DH5) de um stock de glicerol. A cultura foi incubada a 37°C com arejamento a 120 rpm durante seis horas.

200 ml de meio líquido 2YT contendo Ampicilina (concentração final 100 μg/ml) foi inoculado com 10 ml de cultura crescida durante seis horas. A cultura foi incubada a 37°C com arejamento a 120 rpm durante a noite.

800 ml de meio líquido 2YT contendo Ampicilina

(concentração final 100 μg/ml) foi inoculada com 200 ml de cultura crescida durante a noite. A cultura foi incubada a 37°C com arejamento a 120 rpm até a absorvância atingir entre 0,6 e 0,8 unidades de D.O. a 600 nm (geralmente 2-3 horas). A proteína HPV6b L1 HEXAHIS foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM durante 4-6 horas.

As bactérias foram sedimentadas por centrifugação (rotor Beckman JA14 centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos a 20°C). O sedimento foi lavado em 50 ml de soro fisiológico tamponado com fosfatos, ressuspendendo o sedimento bacteriano num tubo de centrífuga de 50 ml. As bactérias lavadas foram novamente sedimentadas por centrifugação (Beckman TJ-6 a 3000 rpm durante 10 minutos a 20°C). O sobrenadante foi rejeitado. O sedimento foi guardado a -20°C ou a -70°C até ser necessário.

Purificação da proteína HPV6b L1 HEXAHIS

As bactérias foram ressuspensas e lisadas em 50 ml de tampão de lise de guanidina (Cloreto de guanidina 6M e 5,8 ml/l de solução A [NaH_2PO_4 177 mM e NaCl 5 mM] pH 7,8 usando HCl). A suspensão foi sonicada com uma saída de 30% durante dois minutos. Os detritos celulares foram sedimentados por centrifugação (rotor Beckman JA21 a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C). O sobrenadante que contem a proteína HPV6b L1 HEXAHIS foi guardado.

A proteína HPV6b L1 HEXAHIS foi substancialmente purificada essencialmente num processo de purificação de dois passos.

O sobrenadante contendo a proteína HPV6b L1 HEXAHIS foi aplicada numa coluna de níquel (2,6 cm x 6 cm) usando um sistema BIORAD ECONO a 4°C. Antes da aplicação do sobrenadante, a coluna foi extensivamente lavada com tampão NA a 1 ml/minuto. O tampão NA compreende ureia 6M, 5,8 ml/litro de solução A [NaH_2PO_4 177 mM e NaCl 5 mM] 94 ml/litro de solução B [Na_2HPO_4 200 mM e NaCl 5 mM] pH 7,8 usando HCl) a pH 7,8 usando HCl antes da adição da ureia. O sobrenadante foi aplicado numa coluna de níquel a um ml/minuto. Fracções de 10 ml foram colhidas no caso da coluna ser sobrecarregada e qualquer proteína não ligada foi removida por lavagem da coluna. Após o sobrenadante ser aplicado, a coluna foi lavada com tampão NB num fluxo de um ml/minuto. O tampão NB compreende ureia 6M e 100 ml/litro de solução A [NaH_2PO_4 177 mM e NaCl 5 mM] a pH 4,0 usando HCl antes da ureia ser adicionada. A coluna foi lavada com tampão NB de acordo com o procedimento na Tabela 1 em que o abaixamento do gradiente de pH removeu proteínas contaminantes. Foram colhidas fracções de 10 ml do eluente.

As fracções contendo proteína HPV6b L1 HEXAHIS foram determinadas por transferência de pontos, ELISA directa ou SDS-PAGE. Após identificação das fracções, a lavagem da coluna continuou com 100% de tampão NB até o pH

estar equilibrado. A coluna foi então lavada com tampão NA. (A coluna foi guardada em etanol a 20%).

As fracções contendo HPV6b L1 HEXAHIS foram reunidas e dialisadas contra cinco litros de dH_2O ou Tris HCl 10 mM pH 7,5, durante a noite a 4°C (ou duas horas à temperatura ambiente). A proteína foi então precipitada com acetona numa proporção de 8:2 de acetona relativamente à amostra, durante duas horas a -70°C ou durante a noite a -20°C. A solução de proteína-acetona foi centrifugada (Beckman TJ-6 a 3000 rpm e a 4°C durante 20 minutos). O sobrenadante foi rejeitado. O sedimento foi seco sob um fluxo de azoto gasoso durante cinco minutos para remover qualquer acetona residual.

O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de ddH_2O e 4-5 ml de tampão de aplicação 4X [1,0 ml de Tris 0,5M pH 6,8, 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de 10% SDS p/v, 0,1 g de DTT 1% p/v, 0,2 ml de azul de bromofenol 0,1% p/v e 4,4 ml de dH_2O]. O sedimento ressuspenso foi aquecido a 65-70°C durante 15 minutos para assegurar que toda a proteína foi dissolvida.

A ressuspensão foi aplicada numa BIORAD Prep Cell compreendendo um gel de separação de 10% (4,5 cm de altura por 4 cm de diâmetro) com um gel de concentração de 4% (4 cm de altura por 4 cm de diâmetro). A Prep Cell foi corrida a uma potência constante de 12W.

Quando a frente de corante no gel atingiu 2 cm do fundo, foram colhidas fracções de 10 ml a uma velocidade de eluição de 1 ml/minuto. As fracções foram testadas relativamente à proteína HPV6b L1 HEXAHIS por transferência de pontos, ELISA directa ou SDS-PAGE (com o sistema Phast). As fracções positivas foram testadas em SDS-PAGE e as que possuíam uma única banda proteica de HPV6b L1 HEXAHIS foram reunidas. As fracções reunidas foram dialisadas contra 5 litros de ddH_2O para remover a glicina. A diálise ocorreu durante a noite a uma temperatura de 4°C e usando duas mudas de ddH_2O.

A proteína HPV6b L1 HEXAHIS dialisada foi precipitada com acetona para remover SDS. Uma proporção de 8:2 de acetona relativamente a amostra foi usada durante duas horas a -70°C ou durante a noite a -20°C. A solução de proteína-acetona foi centrifugada (Beckman TJ-6 a 3000 rpm e a 4°C durante 20 minutos). O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi seco sob uma corrente de azoto gasoso durante cinco minutos para remover qualquer acetona residual.

A proteína foi então capaz de ser ressuspensa num tampão escolhido e a sua concentração determinada. Esta proteína foi subsequentemente demonstrada como formando capsómeros através da purificação da proteína HPV6b L1 HEXAHIS como descrito, remoção gradual de ureia por diálise contra Tris HCl 10 mM pH 7,5 e avaliação do imunoprecipitado resultante por microscopia electrónica de

varrimento. FIG. 2 mostra as estruturas pentaméricas típicas dos agregados da proteína HPV6b L1 HEXAHIS.

EXEMPLO 2: Demonstração da produção de anticorpos contra a proteína HPV6b L1 HEXAHIS

Para produzir anticorpo contra a proteína HPV6b L1 HEXAHIS, ratinhos (estirpe C57Bl/6) foram injectados subcutaneamente duas vezes, com um intervalo de quatro semanas, com 50 μg de proteína/ratinho de acordo com o protocolo experimental na Tabela 2. Duas semanas após a segunda injecção os ratinhos foram sangrados. O soro foi obtido a partir do sangue extraído usando procedimentos convencionais.

O soro foi testado relativamente à produção de anticorpos contra HPV6b L1 HEXAHIS usando três antigénios diferentes.

O soro foi testado contra uma preparação de cápsides de vírus do papiloma humano HPV6B. O soro foi diluído a 1 para 200 e novamente testado contra uma preparação de cápsides de HPV6B em tampão RIPA (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; EDTA 2 mM; NaCl 50 mM; 1% desoxicolato; 1% Triton-X-100; 0,25%SDS; 1% aprotinina; e PMSF 1 mM). Os precipitados de anticorpo-antigénio foram corridos em 10% SDS-PAGE separando os componentes individuais do complexo imune. A presença de proteína HPV6b L1 foi detectada com

anticorpo anti-HPV6b L1. A presença de proteína HPV6b L1 indica que o anticorpo anti-HPV6b L1 foi produzido no ratinho contra a proteína 6b L1 HEXAHIS. Os grupos A, B, C, D, E e F deram resultados positivos.

O soro foi também testado por análise de transferências Western com HPV6b L1 produzido por baculovírus. Um resultado positivo indica que um anticorpo anti-HPV6b L1 foi produzido no ratinho contra a proteína HPV6b L1 HEXAHIS. Os grupos A, B, C, D, E e F deram resultados positivos, sendo o melhor resultado demonstrado quando foi usado hidróxido de alumínio como adjuvante. Os grupos testemunha A, B, C, D e E deram resultados negativos.

O soro foi testado por transferência de pontos e ELISA usando técnicas convencionais contra a proteína L1 do vírus do papiloma bovino. O melhor resultado foi conseguido com soro de ratinhos do grupo D (*i.e.* quando foi usado alumínio como um adjuvante) com uma leitura de DO de 0,96. Este foi seguido de soro do grupo C (*i.e.* com adjuvante completo de Freund) com leitura de DO de 0,70, soro do grupo E (*i.e.* com Algammulin) com leitura de DO de 0,34, depois soro do grupo B (*i.e.* fervido em 1% SDS e arrefecido) com leitura de DO de 0,24 e soro do grupo A (sem adjuvante) com leitura de DO 0,34. Todos os grupos testemunha tinham uma DO de 0,05.

O teste do soro contra três antigénios diferentes

mostrou que a proteína HPV6b L1 HEXAHIS foi imunogénica e produziu anticorpos anti-HBV6b L1 quando usada como antigénio com ou sem adjuvante.

EXEMPLO 3: Demonstração de hipersensibilidade tipo retardado (e confirmação da produção de anticorpos) em ratinhos pela proteína HPV6B L1 HEXAHIS

A hipersensibilidade tipo retardado envolve reacções imunes mediadas por células, assim como algumas reacções imunes humorais. Os ratinhos (estirpe BALB/c) foram tratados (injecção intraperitoneal) com proteína HPV6b L1 HEXAHIS numa variedade de condições descritas na Tabela 3. No dia 11 a injecção na orelha foi mudada para injecção intradérmica) com proteína HPV6 L1 HEXAHIS ou uma outra proteína HEXAHIS. A espessura da orelha foi medida no dia 13 e dia 14. os ratinhos que deram uma resposta positiva no dia 14 foram mortos e a histologia da orelha foi avaliada.

Foi demonstrado neste exemplo que a proteína HPV6b L1 HEXAHIS sem adjuvante induziu uma boa hipersensibilidade do tipo retardado com doses iniciais de 50 μg/ratinho mas não a 5 μg/ratinho. No entanto, os ratinhos necessitaram de ser tratados com pertussigénio para induzir uma resposta de hipersensibilidade tipo retardado.

Relativamente aos três exemplos, foi demonstrado que a proteína HPV6b L1 expressa e isolada no método do

Exemplo 1 formou agregados capsoméricos e os agregados capsoméricos da proteína HPV6b L1 sem adjuvante foram imunogénicos, produzindo uma resposta de anticorpos e uma resposta celular. Assim, a proteína HPV6b L1 HEXAHIS servirá como uma base adequada para uma vacina destinada a evitar a infecção por vírus do papiloma humano, através da indução de anticorpos neutralizantes, ou para tratar lesões existentes através da indução de imunidade celular específica da proteína L1. Os exemplos 1 a 3 usaram a proteína L1 de HPV6b como um exemplo para demonstrar a imunogenicidade da preparação e como um exemplo, o invento não está restringido a este exemplo e qualquer proteína L1 do vírus do papiloma pode ser usada.

EXEMPLO 4: Demonstração de que os anticorpos induzidos contra a proteína HPV6b L1 HEXAHIS reconhecem partículas tipo vírus (VLPs) de HPV6b

Os alvéolos das placas foram revestidos com 0,2 μg de proteína/alvéolo com HPV6b L1 HEXAHIS produzida em *E. coli*, HPV6 VLP-L1 produzido a partir de baculovírus e preparações de baculovírus e *E. coli* (sobrenadantes de fermentação de células) como testemunhas, em PBS a pH 7,2 e deixados a incubar durante a noite à temperatura ambiente. Foi efectuada uma lavagem com PBS a pH 7,2. A ligação não específica foi bloqueada através da incubação das placas com 1% (p/v) de caseína durante 1 hora à temperatura ambiente.

Os anti-soros de coelho anti-HPV6b HEXAHIS foram adicionados a cada um dos alvéolos revestidos com HPV6b L1 HEXAHIS, HPV VLP-1, controlos preparados a partir de baculovírus e controlos preparados a partir de *E. coli* (preparados em duplicado) e foram seriadamente diluídos a ½ ao longo das placas. Os soros induzidos contra o vírus da gripe A/PR-8 foram usados como controlo negativo. Os soros induzidos contra HPV VPL-L1 foram usado como controlo positivo em placas de HPV VLP-L1. As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e foram então lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% (v/v) Tween 20 a pH 7,2. O conjugado de soro de cabra anti-IgG de coelho-HRP foi adicionado a cada um dos alvéolos e as placas foram incubadas e lavadas como anteriormente. A ligação específica do anti-soro ao antigénio foi detectada usando TMB. A reacção foi parada após 5 minutos usando HCl 0,5M.

Resultados

Os resultados da experiência estão apresentados na Tabela 4. Tanto a proteína HPV6b L1 HEXAHIS como HPV6 VLP-L1 complexaram-se com anticorpo induzido contra a proteína HPV6b L1 HEXHIS indicando que HPV6b HEXAHIS L1 apresenta correctamente *in vivo* um ou mais epitoposa presentes em HPV VLP-L1. Os soros induzidos contra a proteína L1 de HPV foram igualmente negativos nos alvéolos de baculovírus ou de *E. coli*, demonstrando a especificidade da reacção. Isto apoia a utilização de HPVL1 HEXAHIS como imunogénio de vacina, adequado para a indução de anticorpos

que podem interagir com o vírus e potencialmente neutralizá-lo. Ainda, este exemplo proporciona suporte a um imunoensaio para a detecção de proteína L1 do vírus do papiloma demonstrado pelo revestimento de várias proteínas em alvéolos e utilização do anticorpo induzido contra a proteína recombinante HPV6 L1 HEXAHIS. Os alvéolos contendo antigénio derivado de HPV6b deram um resultado positivo. Este exemplo também proporciona apoio a um imunoensaio para a detecção de anticorpo específico contra a proteína L1 do vírus do papiloma, demonstrado pelo revestimento dos alvéolos com proteína HPV6b L1 HEXAHIS recombinante e a utilização de soros induzidos contra o vírus da gripe A/PR8 e soros induzidos contra a proteína HPV L1 HEXAHIS. Neste caso, os alvéolos contendo soros induzidos contra a proteína HPV6 L1 HEXAHIS deram um resultado positivo enquanto que o soro induzido contra o vírus da gripe foi negativo.

EXEMPLO 5: Ensaio ELISA de captura demonstrando a formação de complexos anticorpo-estrutura multimérica

As experiências de transferências Western e ELISA foram conduzidas como anteriormente descrito ou seguindo procedimentos convencionais. Um ensaio ELISA de captura foi realizado pelo método que se segue:

(1) um anticorpo monoclonal (moAb 8) específico de VLPs foi usado para revestir os alvéolos de uma placa de microtitulação;

(2) adicionou-se proteína HPV VLP-L1, incubou-se nas condições adequadas e lavou-se com PBS contendo 0,1% Tween 20 a pH 7,4;

(3) os anticorpos induzidos contra vários imunogénios (mostrados na coluna 2 da Tabela 5) em diversos animais (mostrado a coluna 1 da Tabela 5) foram adicionados; e

(4) agentes de detecção adequados (no caso do anti-soro de coelho, usou-se soro de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase) foram usados para detectar o complexo estrutura multimérica NLP-anticorpo.

Resultados

A quantidade de HEXAHIS recombinante do vírus do papiloma por alvéolo está apresentada na Tabela 5. Estas experiências demonstram que o anti-soro induzido contra as proteínas L1 HEXAHIS recombinantes do vírus do papiloma induzem uma resposta imune que reconhece VLP de vírus do papiloma incluindo a proteína L1.

A capacidade de uma proteína L1 de vírus do papiloma para induzir uma resposta imune que reconhece VLP de vírus do papiloma incluindo a proteína L1 requer a apresentação correcta de epitopos adequados. As proteínas L1 recombinantes de vírus do papiloma que não formam VLP não induzem uma resposta imune que reconheça VLPs do vírus do papiloma incluindo a proteína L1. A proteína L1 GST

recombinante de vírus do papiloma, a proteína L1 MS2 recombinante de vírus do papiloma e a proteína L1 desnaturada do vírus do papiloma não induzem uma resposta imune que reconheça VLP de vírus do papiloma incluindo L1. Até à data todas as VLPs têm sido produzidas intracelularmente com a expressão dos genes L1 ou L1 e L2 do vírus do papiloma. A proteína L1 recombinante do vírus do papiloma do presente invento apresenta correctamente um ou mais epitopos para induzir uma resposta imune que reconhece VLP do vírus do papiloma incluindo a proteína L1. A proteína L1 recombinante de vírus do papiloma do presente invento pode formar as estruturas multiméricas ou VLPs extracelularmente. Pensa-se que as estruturas multiméricas de VLPs formadas a partir da proteína L1 recombinante do vírus do papiloma apresente correctamente um ou mais epitopos para induzir uma resposta imune que reconhece as VLPs do vírus do papiloma incluindo a proteína L1. Assim, o invento proporciona uma proteína L1 recombinante do vírus do papiloma que pode formar extracelularmente uma estrutura multimérica ou VLP, a qual pode induzir uma resposta imune que reconhece VLP do vírus do papiloma incluindo a proteína L1 em que a referida estrutura multimérica compreende uma pluralidade de proteínas L1 recombinantes do vírus do papiloma.

O facto de que as estruturas multiméricas ou VLPs puderem formar-se extracelularmente ultrapassa uma série de problemas associados à formação de VLPs intracelulares.

Estes problemas incluem níveis baixos de VLPs, a possibilidade de incorporar DNA na VLP e a possível perda de integridade da VLP com a purificação.

TABELA 1: Procedimento para a lavagem da coluna de níquel com tampão NB

Tempo (minutos)	**% Tampão NB**
0	0
30	0
300	100
310	100
320	100
330	100

TABELA 2: Protocolo experimental para a injecção de ratinhos com a proteína 6b L1 HEXAHIS para produzir anticorpos

Grupo de ratinhos[a]	Adição da proteína 6b L1 HEXAHIS[b]	Outras condições
A	+	Sem adjuvante
A_1	-	Sem adjuvante
B	+	Fervido em 1% SDS e arrefecido
B_1	-	Fervido em 1% SDS e arrefecido
C	+	Com adjuvante completo de Freund
C_1	-	Com adjuvante completo de Freund
D	+	Adsorvido a hidróxido de alumínio
D_1	-	Adsorvido a hidróxido de alumínio
E	+	Com Algammulina
E_1	-	Com Algammulina
F	+	Com L2 (50 μg) e sem adjuvante

TABELA 3: Protocolo exxperimental para a produção de hipersensibilidade tipo retardado contra a proteína 6b L1 HEXAHIS em ratinhos

Grupo de ratinhos	Antigénio[a]	Adjuvante[c]	Dose de antigénio	Inoculação[b,d]	Pertussigen	Dose de Antigénio	Inchaço Médio da orelha Dia 14[e]
1	L1	PBS	50 µg	L1	+	4	4,5
2	L1	PBS	50 µg	L1	+	13,8	
3	L1	PBS	50 µg	L1	-	3,8	1,5
4	L1	PBS	50 µg	L1	-	2,4	3,8
5	L1	PBS	50 µg	IRR	+		
6	Soro fisiológico	PBS		L1	+	4,7	1,3
7	Soro fisiológico	PBS		L1	-	2,3	1
8	L1	CFA (0,1 ml)	50 µg	L1	+	19,3	16,8
9	Soro fisiológico	CFA (0,1 ml)		L1	+	4,8	2
10	L1	QuilA (µg)	50 µg	L1	+	15,7	8,7
11	L1	QuilA (µg)	50 µg	L1	-	7,2	0,2
12	L1	QuilA (µg)	50 µg	IRR	+		
13	Soro fisiológico	QuilA (µg)	50 µg	L1	+		

TABELA 4: Resultados de ELISA usando anti-soro de coelho anti-HPV6b L1 HEXAHIS

Antigénio	**ELISA usando anti-soro de coelho anti HPV6b L1 HEXAHIS**
HPV6b VLP-1	>4,0 excede os limites @ 1:4000
HPV6b L1 HEXAHIS	2,12 ± 0,1 @ 1:4000
Preparação controlo de baculovírus	0,63 ± 0,01 @ 1:4000
Preparação controlo de *E. coli*	0,12 ± 0,00 @ 1:4000

TABELA 5: Resultados de experiências conduzidas no Exemplo 5

ANIMAL Nº	IMUNOGÉNIO	ADJUVANTE	IMUNO-REACTIVIDADE COM A PROTEÍNA L1			IMUNO-REACTIVIDADE COM L1 NEM CÉLULAS	
			Transferência Western	ELISA (VLPs)	ELISA captura	L1 como VLP	L1 como HEXAHIS
Coelho 31	HEXAHIS L1	CFA	++++	1,72@ 1:100	0,538@ 1:100	+++	+++
Coelho 39	HEXAHIS L1	Nil	++	0,095@ 1:100	0,050@ 1:100	+++	?
Coelho 10	VLPs (baculovírus)	Nil	+++	0,972@ 1:100	0,487@ 1:100	?	?
Ratinho	HEXAHIS L1	Nil	++	?	ND	?	?
Ratinho	HEXAHIS L1	CFA	++++	0,400@ 1:100	ND	?	?
MoAb 8	Proteína de fusão GST L1	CFA/IFA	++++	++++	ND	+++	?

LEGENDAS

TABELA 2

[a] cada um dos grupos de ratinhos contem quatro animais

[b] proteína 6b L1 HEXAHIS foi administrada a 50 μg de proteína por ratinho

TABELA 3

[a] Os grupos consistem em 4 a 6 ratinhos Balb/C (68-102)

[b] L1 significa proteína 6b L1 HEXAHIS e IRR significa proteína HEXAHIS irrelevante

[c] PBS é soro fisiológico tamponado com fosfatos e CFA é adjuvante completo de Freund

[d] proteína 6b L1 HEXAHIS foi administrada a 10 μg num volume máximo de 2 μl

[e] adicionou-se 30 μg de pertussigénio

[f] Medições da orelha (μm x 10)

TABELA 5

ND: não pode ser determinado tecnicamente

FIGURA 1

Sequência nucleotídica de DNA e sequência de aminoácidos da proteína HPV6b L1 HEXAHIS (SEQ ID NO:3)

FIGURA 2

Macrografia electrónica das estruturas pentaméricas dos agregados da proteína HPV6b L1 HEXAHIS

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

(A) NOME: The University of Queensland
(B) RUA:
(C) CIDADE: St. Lucia
(E) PAÍS: Austrália
(F) CÓDIGO POSTAL: QLD 4072

(ii) TÍTUTLO DO INVENTO: L1 recombinante do vírus do papiloma

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 7

(iv) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: Disquete
(B) COMPUTADOR: Compatível com IBM PC
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão #1.30 (EPO)

(v) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
NÚMERO DO PEDIDO:PCT/AU95/00292

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 32 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADEIA:
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

```
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1               5                  10                  15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
            20                  25                  30
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 96 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: ambas
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
(iii) HIPOTÉTICA: Não
(iv) COMPLEMENTAR DA CADEIA CODIFICADORA: Não
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

```
ATGCGGGGTT CTCATCATCA TCATCATCAT GGTATGGCTA GCATGACTGG TGGACAGCAA      60

ATGGGTCGGG ATCTGTACGA CGATGACGAT AAGGAT                               96
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1599 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: ambas
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
(iii) HIPOTÉTICA: Não
(iv) COMPLEMENTAR DA CADEIA CODIFICADORA: Não
(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE:CDS
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..1596
(D) OUTRA INFORMAÇÃO;/produto = "proteína HPV6bL1 HEXAHIS"

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

```
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT        48
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
  1               5                  10                  15

GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT        96
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
            20                  25                  30

ATG TGG CGG CCT AGC GAC AGC ACA GTA TAT GTG CCT CCT CCT AAC CCT       144
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
        35                  40                  45

GTA TCC AAA GTT GTT GCC ACG GAT GCT TAT GTT ACT CGC ACC AAC ATA       192
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile
    50                  55                  60

TTT TAT CAT GCC AGC AGT TCT AGA CTT CTT GCA GTG GGA CAT CCT TAT       240
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
65                  70                  75                  80

TTT TCC ATA AAA CGG GCT AAC AAA ACT GTT GTG CCA AAG GTG TCA GGA       288
Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
                85                  90                  95

TAT CAA TAC AGG GTA TTT AAG GTG GTG TTA CCA GAT CCT AAC AAA TTT       336
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
            100                 105                 110
```

```
GCA TTG CCT GAC TCG TCT CTT TTC GAT CCC ACA ACA CAA CGT TTA CTA      384
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
        115                 120                 125

TGG GCA TGC ACA GGC CTA GAG GTG GGC AGG GGA CAG CCA TTA GGT GTG      432
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
    130                 135                 140

GGT GTA AGT GGA CAT CCT TTC CTA AAT AAA TAT GAT GAT GTT GAA AAT      480
Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
145                 150                 155                 160

TCA GGG AGT GGT GGT AAC CCT GGA CAG GAT AAC AGG GTT AAT GTA GGT      528
Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
                165                 170                 175

ATG GAT TAT AAA CAA ACA CAA TTA TGC ATG GTT GGA TGT GCC CCC CCT      576
Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
            180                 185                 190

TTG GGC GAG CAT TGG GGT AAA GGT AAA CAG TGT ACT AAT ACA CCT GTA      624
Leu Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
        195                 200                 205

CAG GCT GGT GAC TGC CCG CCC TTA GAA CTT ATT ACC AGT GTT ATA CAG      672
Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
    210                 215                 220

GAT GGC GAT ATG GTT GAC ACA GGC TTT GGT GCT ATG AAT TTT GCT GAT      720
Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
225                 230                 235                 240

TTG CAG ACC AAT AAA TCA GAT GTT CCT ATT GAC ATA TGT GGC ACT ACA      768
Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
                245                 250                 255

TGT AAA TAT CCA GAT TAT TTA CAA ATG GCT GCA GAC CCA TAT GGT GAT      816
Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
            260                 265                 270

AGA TTA TTT TTT TTT CTA CGG AAG GAA CAA ATG TTT GCC AGA CAT TTT      864
Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe
        275                 280                 285

TTT AAC AGG GCT GGC GAG GTG GGG GAA CCT GTG CCT GAT ACA CTT ATA      912
Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile
    290                 295                 300

ATT AAG GGT AGT GGA AAT CGC ACG TCT GTA GGG AGT AGT ATA TAT GTT      960
Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val
305                 310                 315                 320

AAC ACC CCG AGC GGC TCT TTG GTG TCC TCT GAG GCA CAA TTG TTT AAT     1008
Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn
                325                 330                 335
```

```
AAG CCA TAT TGG CTA CAA AAA GCC CAG GGA CAT AAC AAT GGT ATT TGT      1056
Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
            340                 345                 350

TGG GGT AAT CAA CTG TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACC ACA CGC AGT ACC      1104
Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr
        355                 360                 365

AAC ATG ACA TTA TGT GCA TCC GTA ACT ACA TCT TCC ACA TAC ACC AAT      1152
Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn
    370                 375                 380

TCT GAT TAT AAA GAG TAC ATG CGT CAT GTG GAA GAG TAT GAT TTA CAA      1200
Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
385                 390                 395                 400

TTT ATT TTT CAA TTA TGT AGC ATT ACA TTG TCT GCT GAA GTA ATG GCC      1248
Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala
                405                 410                 415

TAT ATT CAC ACA ATG AAT CCC TCT GTT TTG GAA GAC TGG AAC TTT GGG      1296
Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
            420                 425                 430

TTA TCG CCT CCC CCA AAT GGT ACA TTA GAA GAT ACC TAT AGG TAT GTG      1344
Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
        435                 440                 445

CAG TCA CAG GCC ATT ACC TGT CAA AAG CCC ACT CCT GAA AAG GAA AAG      1392
Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
    450                 455                 460

CCA GAT CCC TAT AAG AAC CTT AGT TTT TGG GAG GTT AAT TTA AAA GAA      1440
Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
465                 470                 475                 480

AAG TTT TCT AGT GAA TTG GAT CAG TAT CCT TTG GGA CGC AAG TTT TTG      1488
Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
                485                 490                 495

TTA CAA AGT GGA TAT AGG GGA CGG TCC TCT ATT CGT ACA GGT GTT AAG      1536
Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys
            500                 505                 510

CGC CCT GCT GTT TCC AAA GCC TCT GCT GCC CCT AAA CGT AAG CGC GCC      1584
Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala
        515                 520                 525

AAA ACT AAA AGG TAA                                                 1599
Lys Thr Lys Arg
    530
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 532 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

```
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1               5                  10                  15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
            20                  25                  30

Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
        35                  40                  45

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

Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
65                  70                  75                  80

Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
                85                  90                  95

Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
            100                 105                 110

Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
        115                 120                 125

Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
    130                 135                 140

Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
                165                 170                 175

Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
            180                 185                 190

Leu Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
        195                 200                 205

Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
    210                 215                 220

Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
225                 230                 235                 240

Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
                245                 250                 255

Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
            260                 265                 270

Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe
        275                 280                 285
```

```
Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile
    290                 295                 300

Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val
305                 310                 315                 320

Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn
                325                 330                 335

Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
            340                 345                 350

Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr
        355                 360                 365

Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn
    370                 375                 380

Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
385                 390                 395                 400

Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala
                405                 410                 415

Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
            420                 425                 430

Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
        435                 440                 445

Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
    450                 455                 460

Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
465                 470                 475                 480

Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
                485                 490                 495

Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys
            500                 505                 510

Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala
        515                 520                 525

Lys Thr Lys Arg
    530
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 41 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico

(iii) HIPOTÉTICA: Não
(iv) COMPLEMENTAR DA CADEIA CODIFICADORA: Não
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

GCGGATCCAG ATGTGGCGGC CTAGCGACAG CACAGTATAT G 41

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 43 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
(iii) HIPOTÉTICA: Não
(iv) COMPLEMENTAR DA CADEIA CODIFICADORA: Não
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

CGCCCGGGTT ACCTTTTAGT TTTGGCCTCG CTTACGTTTT AGG 43

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 31 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Lisboa, 22 de Dezembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Uma estrutura pentamérica compreendendo uma pluralidade de proteínas L1 do vírus do papiloma, em que uma ou mais das referidas proteínas L1 do papiloma é uma proteína de fusão recombinante compreendendo uma sequência de aminoácido N-terminal capaz de se ligar a níquel e é obtida a partir de uma bactéria em condições desnaturantes.

2. A estrutura pentamérica da reivindicação 1, em que a referida proteína L1 recombinante do vírus do papiloma é uma proteína de fusão recombinante compreendendo uma sequência de aminoácidos N-terminal capaz de se ligar a níquel e é obtida a partir de uma bactéria em condições desnaturantes.

3. A estrutura pentamérica da Reivindicação 1 ou Reivindicação 2, em que a ou as proteínas L1 recombinantes do vírus do papiloma possuem uma sequência de aminoácidos N-terminal compreendendo $(His)_6$.

4. A estrutura pentamérica da Reivindicação 1 ou Reivindicação 2, em que a ou as proteínas L1 recombinantes do vírus do papiloma compreendem uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:4.

5. A estrutura pentamérica da Reivindicação 1

ou Reivindicação 2, que é capaz de induzir uma resposta imune que reconhece VLP do vírus do papiloma.

6. Uma vacina terapêutica ou profiláctica compreendendo a estrutura pentamérica da Reivindicação 1.

7. A vacina terapêutica ou profiláctica da Reivindicação 6, compreendendo ainda um adjuvante.

Lisboa, 22 de Dezembro de 2006

FIG. 1


HEXAHIS leader
ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
MetArgGlySerHisHisHisHisHisHisGlyMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGln
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGAT
MetGlyArgAspLeuTyrAspAspAspAspLysAsp
HPV6BL1
5820
ATGTGGCGGCCTAGCGACAGCACAGTATATGT
TACACCGCCGGATCGCTGTCGTGTCATATACA
MetTrpArgProSerAspSerThrValTyrVal
5880
GCCTCCTCCTAACCCTGTATCCAAAGTTGTTGCCACGGATGCTTATGTTACTCGCACCAA
CGGAGGAGGATTGGGACATAGGTTTCAACAACGGTGCCTACGAATACAATGAGCGTGGTT
ProProProAsnProValSerLysValValAlaThrAspAlaTyrValThrArgThrAsn
5940
CATATTTTATCATGCCAGCAGTTCTAGACTTCTTGCAGTGGGACATCCTTATTTTTCCAT
GTATAAAATAGTACGGTCGTCAAGATCTGAAGAACGTCACCCTGTAGGAATAAAAAGGTA
IlePheTyrHisAlaSerSerSerArgLeuLeuAlaValGlyHisProTyrPheSerIle
6000
AAAACGGGCTAACAAAACTGTTGTGCCAAAGGTGTCAGGATATCAATACAGGGTATTTAA
TTTTGCCCGATTGTTTTGACAACACGGTTTCCACAGTCCTATAGTTATGTCCCATAAATT
LysArgAlaAsnLysThrValValProLysValSerGlyTyrGlnTyrArgValPheLys
6060
GGTGGTGTTACCAGATCCTAACAAATTTGCATTGCCTGACTCGTCTCTTTTCGATCCCAC
CCACCACAATGGTCTAGGATTGTTTAAACGTAACGGACTGAGCAGAGAAAAGCTAGGGTG
ValValLeuProAspProAsnLysPheAlaLeuProAspSerSerLeuPheAspProThr
6120
AACACAACGTTTAGTATGGGCATGCACAGGCCTAGAGGTGGGCAGGGGACAGCCATTAGG
TTGTGTTGCAAATCATACCCGTACGTGTCCGGATCTCCACCCGTCCCCTGTCGGTAATCC
ThrGlnArgLeuValTrpAlaCysThrGlyLeuGluValGlyArgGlyGlnProLeuGly
6180
TGTGGGTGTAAGTGGACATCCTTTCCTAAATAAATATGATGATGTTGAAAATTCAGGGAG
ACACCCACATTCACCTGTAGGAAAGGATTTATTTATACTACTACAACTTTTAAGTCCCTC
ValGlyValSerGlyHisProPheLeuAsnLysTyrAspAspValGluAsnSerGlySer

6240

TGGTGGTAACCCTGGACAGGATAACAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACACA
ACCACCATTGGGACCTGTCCTATTGTCCCAATTACATCCATACCTAATATTTGTTTGTGT

GlyGlyAsnProGlyGlnAspAsnArgValAsnValGlyMetAspTyrLysGlnThrGln

6300

ATTATGCATGGTTGGATGTGCCCCCCCTTTGGGCGAGCATTGGGGTAAAGGTAAACAGTG
TAATACGTACCAACCTACACGGGGGGGAAACCCGCTCGTAACCCCATTTCCATTTGTCAC

LeuCysMetValGlyCysAlaProProLeuGlyGluHisTrpGlyLysGlyLysGlnCys

6360

TACTAATACACCTGTACAGGCTGGTGACTGCCCGCCCTTAGAACTTATTACCAGTGTTAT
ATGATTATGTGGACATGTCCGACCACTGACGGGCGGGAATCTTGAATAATGGTCACAATA

ThrAsnThrProValGlnAlaGlyAspCysProProLeuGluLeuIleThrSerValIle

6420

ACAGGATGGCGATATGGTTGACACAGGCTTTGGTGCTATGAATTTTGCTGATTTGCAGAC
TGTCCTACCGCTATACCAACTGTGTCCGAAACCACGATACTTAAAACGACTAAACGTCTG

GlnAspGlyAspMetValAspThrGlyPheGlyAlaMetAsnPheAlaAspLeuGlnThr

6480

CAATAAATCAGATGTTCCTATTGACATATGTGGCACTACATGTAAATATCCAGATTATTT
GTTATTTAGTCTACAAGGATAACTGTATACACCGTGATGTACATTTATAGGTCTAATAAA

AsnLysSerAspValProIleAspIleCysGlyThrThrCysLysTyrProAspTyrLeu

6540

ACAAATGGCTGCAGACCCATATGGTGATAGATTATTTTTTTTTCTACGGAAGGAACAAAT
TGTTTACCGACGTCTGGGTATACCACTATCTAATAAAAAAAAAGATGCCTTCCTTGTTTA

GlnMetAlaAlaAspProTyrGlyAspArgLeuPhePhePheLeuArgLysGluGlnMet

6600

GTTTGCCAGACATTTTTTTAACAGGGCTGGCGAGGTGGGGGAACCTGTGCCTGATACACT
CAAACGGTCTGTAAAAAAAATTGTCCCGACCGCTCCACCCCCTTGGACACGGACTATGTGA

PheAlaArgHisPhePheAsnArgAlaGlyGluValGlyGluProValProAspThrLeu

6660

TATAATTAAGGGTAGTGGAAATCGCACGTCTGTAGGGAGTAGTATATATGTTAACACCCC
ATATTAATTCCCATCACCTTTAGCGTGCAGACATCCCTCATCATATATACAATTGTGGGG

IleIleLysGlySerGlyAsnArgThrSerValGlySerSerIleTyrValAsnThrPro

6720

GAGCGGCTCTTTGGTGTCCTCTGAGGCACAATTGTTTAATAAGCCATATTGGCTACAAAA
CTCGCCGAGAAACCACAGGAGACTCCGTGTTAACAAATTATTCGGTATAACCGATGTTTT

SerGlySerLeuValSerSerGluAlaGlnLeuPheAsnLysProTyrTrpLeuGlnLys

```
6780
AGCCCAGGGACATAACAATGGTATTTGTTGGGGTAATCAACTGTTTGTTACTGTGGTAGA
TCGGGTCCCTGTATTGTTACCATAAACAACCCCATTAGTTGACAAACAATGACACCATCT

AlaGlnGlyHisAsnAsnGlyIleCysTrpGlyAsnGlnLeuPheValThrValValAsp


6840
TACCACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTAACTACATCTTCCACATACAC
ATGGTGTGCGTCATGGTTGTACTGTAATACACGTAGGCATTGATGTAGAAGGTGTATGTG

ThrThrArgSerThrAsnMetThrLeuCysAlaSerValThrThrSerSerThrTyrThr


6900
CAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAATTTATTTT
GTTAAGACTAATATTTCTCATGTACGCAGTACACCTTCTCATACTAAATGTTAAATAAAA

AsnSerAspTyrLysGluTyrMetArgHisValGluGluTyrAspLeuGlnPheIlePhe


6960
TCAATTATGTAGCATTACATTGTCTGCTGAAGTAATGGCCTATATTCACACAATGAATCC
AGTTAATACATCGTAATGTAACAGACGACTTCATTACCGGATATAAGTGTGTTACTTAGG

GlnLeuCysSerIleThrLeuSerAlaGluValMetAlaTyrIleHisThrMetAsnPro


7020
CTCTGTTTTGGAAGACTGGAACTTTGGGTTATCGCCTCCCCCAAATGGTACATTAGAAGA
GAGACAAAACCTTCTGACCTTGAAACCCAATAGCGGAGGGGGTTTACCATGTAATCTTCT

SerValLeuGluAspTrpAsnPheGlyLeuSerProProProAsnGlyThrLeuGluAsp


7080
TACCTATAGGTATGTGCAGTCACAGGCCATTACCTGTCAAAAGCCCACTCCTGAAAAGGA
ATGGATATCCATACACGTCAGTGTCCGGTAATGGACAGTTTTCGGGTGAGGACTTTTCCT

ThrTyrArgTyrValGlnSerGlnAlaIleThrCysGlnLysProThrProGluLysGlu


7140
AAAGCCAGATCCCTATAAGAACCTTAGTTTTTGGGAGGTTAATTTAAAAGAAAAGTTTTC
TTTCGGTCTAGGGATATTCTTGGAATCAAAAACCCTCCAATTAAATTTTCTTTTCAAAAG

LysProAspProTyrLysAsnLeuSerPheTrpGluValAsnLeuLysGluLysPheSer


7200
TAGTGAATTGGATCAGTATCCTTTGGGACGCAAGTTTTTGTTACAAAGTGGATATAGGGG
ATCACTTAACCTAGTCATAGGAAACCCTGCGTTCAAAAACAATGTTTCACCTATATCCCC

SerGluLeuAspGlnTyrProLeuGlyArgLysPheLeuLeuGlnSerGlyTyrArgGly


7260
ACGGTCCTCTATTCGTACAGGTGTTAAGCGCCCTGCTGTTTCCAAAGCCTCTGCTGCCCC
TGCCAGGAGATAAGCATGTCCACAATTCGCGGGACGACAAAGGTTTCGGAGACGACGGGG

ArgSerSerIleArgThrGlyValLysArgProAlaValSerLysAlaSerAlaAlaPro

          TAAACGTAAGCGCGCCAAAACTAAAAGGTAA  7291
          ATTTGCATTCGCGCGGTTTTGATTTTCCATT

          LysArgLysArgAlaLysThrLysArgTer
```

FIG. 2

