



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 280 104**

(51) Int. Cl.:  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98950930 .2**  
(86) Fecha de presentación : **06.10.1998**  
(87) Número de publicación de la solicitud: **1021547**  
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2000**

(54) Título: **Formulaciones de vacunas que contienen capsómeras del virus de papiloma humano y métodos de uso.**

(30) Prioridad: **06.10.1997 US 944368**

(73) Titular/es: **Loyola University of Chicago**  
**820 North Michigan Avenue**  
**Chicago, Illinois 60611, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.09.2007**

(72) Inventor/es: **Gissmann, Lutz y**  
**Müller, Martin**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.09.2007**

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 280 104 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones de vacunas que contienen capsómeras del virus de papiloma humano y métodos de uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con formulaciones de vacunas que contienen proteínas del virus de papiloma, ya sea como proteínas de fusión, como proteínas truncadas, o como proteínas de fusión truncadas. La invención abarca además métodos para producir capsómeras de las formulaciones, así como métodos profilácticos y terapéuticos para su uso.

**Antecedentes**

Las infecciones con ciertas cepas de alto riesgo de virus de papiloma genital en humanos (HPV) - por ejemplo, HPV 16, 18 ó 45- se cree que son el principal factor de riesgo para la formación de tumores malignos del tracto anogenital. Entre las posibles malignidades, el carcinoma cervical es con mucho el más frecuente: de acuerdo a un estimativo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), casi 500.000 nuevos casos de la enfermedad se presentan cada año. Debido a la frecuencia con la cual se presenta esta patología, la conexión entre la infección con HPV y el carcinoma cervical ha sido extensamente examinada, conduciendo a numerosas generalizaciones.

Por ejemplo, las lesiones precursoras de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) se sabe que son causadas por infecciones con el virus de papiloma [Crum. *New Eng. J. Med.* 310:880-883 (1984)]. El ADN de los genomas de ciertos tipos de HPV, incluidas por ejemplo, las cepas 16, 18, 33, 35, y 45, han sido detectadas en más del 95% de las biopsias de tumor de pacientes con este desorden, así como en líneas de células primarias cultivadas a partir de los tumores. Aproximadamente se ha encontrado que 50 a 70% de las biopsias de las células tumorales de CIN incluyen ADN derivado únicamente de HPV 16.

Los productos proteicos de los genes tempranos E6 y E7 de HPV 16 y de HPV 18 han sido detectados en líneas celulares de carcinoma cervical así como en queratinocitos humanos transformados *in vitro* [Wettstein, y colaboradores, en PAPILLOMA VIRUSES AND HUMAN CANCER, Pfister (Ed.), CRC Press: Boca Ratón, FL 1990 páginas 155-179] y un porcentaje significativo de pacientes con carcinoma cervical tienen anticuerpos anti-E6 o anti-E7. Se ha observado que las proteínas E6 y E7 participan en la inducción de la síntesis de ADN celular en células humanas, en la transformación de queratinocitos humanos y de otros tipos de células, y en la formación de tumores en ratones transgénicos [Arbelt, y colaboradores, *J. Virol.*, 68:4358-4364 (1994); Auewarakul, y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 14:8250-8258 (1994); Barbosa y colaboradores, *J. Virol.* 65:292-298 (1991); Kaur, y colaboradores, *J. Gen. Virol.* 70:1261-1266 (1989); Schlegel y colaboradores, *EMBO J.* 7:3181-3187 (1988)]. La expresión constitutiva de las proteínas E6/E7 parece ser necesaria para mantener la condición transformada de los tumores positivos del HPV.

A pesar de la capacidad de algunas cepas del HPV para inducir fenotipos neoplásicos *in vivo* e *in vitro*, no obstante otros tipos de HPV causan verrugas genitales benignas tales como la condylomata acuminata y solamente se las asocia raramente con tumores malignos [Ikenberg, En Gross, y colaboradores, (eds.) GENITAL PAPILLOMAVIRUS INFECTIONS. Springer Verlag: Berlin, páginas 87-112]. Las cepas de bajo riesgo de este tipo incluyen, por ejemplo, HPV 6 y 11.

Más a menudo, los virus de papiloma genital se transmiten entre humanos durante el coito que en muchos casos conduce a una infección persistente en la membrana mucosa anogenital. Mientras que esta observación sugiere que o bien la infección primaria induce una respuesta inmune inadecuada o que el virus ha desarrollado la habilidad para evitar la vigilancia inmunológica, otras observaciones sugieren que el sistema inmunológico es activo durante la manifestación primaria así como durante el curso maligno de las infecciones por el virus de papiloma [Altmann y colaboradores en VIRUSES AND CANCER, Minson y colaboradores, (eds.) Cambridge University Press, (1994) páginas 71-80].

Por ejemplo, la manifestación clínica de la infección primaria por parte del virus de papiloma bovino o de conejo se puede prevenir por medio de vacunación con extractos de verruga o de proteínas estructurales virales [Altmann, y colaboradores, *supra*; Campo, Curr. Top. En *Microbiol and Immunol.* 186:255-266 (1994); Yindle y Frazer, Curr. Top. En *Microbiol and Immunol.* 186:217-253 (1994)]. Los roedores previamente vacunados con vacunas recombinantes que codifican a las proteínas tempranas E6 o E7 de HPV 16, o con péptidos sintéticos E6 o E7, se protegen en forma similar de la formación de tumores después de la inoculación de células autólogas transformadas con HPV 16 [Altman, y colaboradores, *supra*; Campo, y colaboradores, *supra*; Yindle y Frazer, y colaboradores, *supra*]. La regresión de las verrugas puede ser inducida por medio de la transferencia de linfocitos a partir de animales regresores después de la infección por medio de virus de papiloma animal. Finalmente, en pacientes inmunosuprimidos, tales como, por ejemplo, los receptores de transplantes de órganos o individuos infectados con VIH, la incidencia de verrugas genitales, CIN, y cáncer anogenital es elevada.

*Virology* 234, 1997, páginas 93-111 divulga métodos para producir partículas de tipo virus de papiloma quimérico que constan de proteínas de fusión HPV 16L1 y E7. Li y colaboradores (1997), *J. Virology* 71, 2988-2995 divulga la obtención de capsómeras por medio de la escisión con tripsina.

Hasta la fecha, no se habían descrito vacunas del HPV que contuvieran proteína L1 tardía del virus de papiloma humano en forma de capsómeros que sean adecuadas tanto para propósitos profilácticos como terapéuticos. Ya que la proteína L1 no está presente en lesiones genitales malignas, la vacunación con proteína L1 no tienen ningún potencial terapéutico para estos pacientes. La construcción de proteínas quiméricas, que comprende residuos aminoácidos de proteína L1 y, por ejemplo proteína E6 o E7, que da lugar a capsómeros quiméricos, combina funciones terapéuticas y profilácticas de una vacuna. Un método para la producción de un alto nivel de capsómeros quiméricos sería por lo tanto particularmente deseable, en vista de las posibles ventajas ofrecidas por tal vacuna para intervención profiláctica y terapéutica.

Por lo tanto, existe la necesidad en el arte de proveer formulaciones de vacunas que puedan prevenir o tratar una infección del HPV. Los métodos para producir formulaciones de vacunas que superen los problemas conocidos en el estado del arte asociados con la expresión de la proteína recombinante del HPV y la purificación serían manifiestamente útiles para tratar a la población de individuos ya infectada con HPV así como también sería útil para inmunizar a la población de individuos susceptibles a la infección por el HPV.

### Resumen de la invención

La presente invención provee formulaciones de vacunas terapéuticas y profilácticas que contienen capsómeros quiméricos de papiloma humano. La invención también provee métodos terapéuticos para tratar pacientes infectados con un HPV así como métodos profilácticos para prevenir la infección con HPV en un individuo susceptible. Se contemplan también métodos para la producción y purificación de capsómeros y de proteínas de la invención.

En un aspecto de la invención, las vacunaciones profilácticas para la prevención de la infección por el HPV se considera que incorporan a las proteínas estructurales L1 y L2 del virus de papiloma. El desarrollo de una vacuna de este tipo enfrenta obstáculos significativos debido a que el virus del papiloma no se puede propagar en títulos adecuados en cultivos celulares o de otros sistemas experimentales para proveer las proteínas virales en cantidad suficiente para la producción económica de la vacuna. Además, las metodologías recombinantes para expresar las proteínas no son siempre directas y a menudo resultan en un bajo rendimiento de proteína. Recientemente, las partículas tipo virus (las VLP), en forma similar a la formación de las estructuras de la cápside viral, se ha descrito que se forman en células Sf-9 de insectos por expresión de las proteínas virales L1 y L2 (o L1 por sí misma) utilizando una vacuna recombinante o baculovirus. La purificación de las VLP se puede lograr muy simplemente por medio de centrifugación en gradientes de CsCl o de sacarosa [Kirnbauer, y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 99:12180-12814 (1992); Kirnbauer, y colaboradores, *J. Virol.* 67:6929-6936 (1994); Proso, y colaboradores, *J. Virol.* 67:14:1936-1944 (1992); Sasagawa y colaboradores, *Virology* 2016:126-195 (1995); Volpers y colaboradores, *J. Virol.* 69:3258-3264 (1995); Zhou y colaboradores, *J. Gen. Virol.* 74:762-769 (1993); Zhou y colaboradores, *Virology* 185:251-257 (1991)]. WO 93/02184 describe un método en el cual las partículas tipo virus de papiloma (las VLP) se utilizan para aplicaciones diagnósticas o como una vacuna contra infecciones causadas por el virus del papiloma. WO 94/00152 describe la producción Recombinante de proteína L1 que imita al epítipo conformacional de neutralización sobre viriones de papiloma humano o animal.

En otro aspecto de la invención, se proveen vacunas terapéuticas para aliviar las complicaciones de, por ejemplo, carcinoma cervical o lesiones precursoras resultantes de la infección con virus de papiloma, y por lo tanto representan una alternativa para la intervención profiláctica. Las vacunas de este tipo pueden contener proteínas tempranas del virus de papiloma, principalmente E6 o E7, que se expresan en las células persistentemente infectadas. Se asume que, después de la administración de una vacuna de este tipo, las células T citotóxicas pueden ser activadas contra las células persistentemente infectadas en lesiones genitales. La población objetivo para intervención terapéutica son los pacientes con lesiones genitales malignas o premalignas asociadas con el HPV. La solicitud PCT de patente WO 93/20844 divulga que la proteína temprana E7 y los fragmentos antigénicos de la misma del virus de papiloma de HPV o de BPV son terapéuticamente efectivos en la regresión, pero no en la prevención, de tumores causados por el virus de papiloma en mamíferos. Mientras que las proteínas tempranas del HPV han sido producidas por medio de expresión recombinante en *E. coli* o en tipos adecuados de células eucariotas, la purificación de las proteínas recombinantes ha probado ser difícil debido a la baja solubilidad inherente y a los procedimientos complejos de purificación que generalmente requieren de una combinación de etapas, incluida cromatografía de intercambio iónico, filtración por gel y cromatografía de afinidad.

De acuerdo con la presente invención, se suministran las formulaciones de vacunas que contienen capsómeros del virus de papiloma que comprenden ya sea: (i) una proteína viral truncada; (ii) una proteína viral truncada expresada como una proteína de fusión que contiene en parte residuos aminoácidos de una segunda proteína, o (iii) alguna combinación de los dos tipos de proteínas. De acuerdo con la invención, las formulaciones para vacuna se suministran con un contenido de capsómeros de virus de papiloma bovino (BPV) y de virus de papiloma humano. Las capsómeros preferidas de virus bovino contienen proteína del virus de papiloma bovino tipo I. Las capsómeros preferidas de virus humano contienen proteínas de cualquiera de las cepas del virus de papiloma humano HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV33, HPV35 y HPV45. Las formulaciones más preferidas para la vacuna comprenden capsómeros que contienen proteínas de HPV16.

En un aspecto de la invención, se proveen formulaciones capsómeros para la vacuna que contienen proteínas virales truncadas que contienen una supresión de uno o más residuos aminoácidos necesarios para la formación de una partícula tipo virus. Se prefiere que la supresión de aminoácidos no inhiba la formación de capsómeros por medio

de la proteína truncada, y se prefiere más que la supresión favorezca la formación de capsómeras. Las formulaciones preferidas para la vacuna de este tipo incluyen a las capsómeras que contienen L1 truncada con o sin proteínas virales L2. Las capsómeras particularmente preferidas contienen proteínas L1 truncadas. Las proteínas truncadas contempladas por la invención incluyen a aquellas que tienen uno o más residuos aminoácidos suprimidos del carboxi terminal de la proteína, o uno o más residuos aminoácidos suprimidos del amino terminal de la proteína, o uno o más residuos aminoácidos suprimidos de una región interna (esto es, no de cualquiera de los terminales) de la proteína. Las formulaciones preferidas de capsómeras para la vacuna contienen proteínas truncadas en el carboxi terminal. En las formulaciones que incluyen a la proteína L1 derivada de HPV16, se prefiere suprimir desde los residuos 1 hasta 34 de los aminoácidos carboxi terminales. También se contemplan las supresiones relativamente cortas que ofrecen la ventaja de una modificación menor de las propiedades antigénicas de las proteínas L1 y de las capsómeras formadas a partir de las mismas. Se prefiere más sin embargo, suprimir 34 residuos aminoácidos de la secuencia L1, correspondiente a los aminoácidos 472 a 505 en HPV16 expuestos en la SEQ ID NO: 2, y codificados por medio de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los nucleótidos 1414 a 1516 en la secuencia de codificación L1 de HPV16 expuesta en la SEQ ID NO: 1.

Cuando se elabora una formulación de una vacuna de capsómera con proteínas que sufren una supresión interna, se prefiere que la secuencia de aminoácidos suprimida comprenda la región nuclear de localización de la proteína. En la proteína L1 de HPV16, la señal nuclear de localización se encuentra aproximadamente entre el residuo aminoácido 499 hasta aproximadamente el residuo aminoácido 505. Después de la expresión de las proteínas L1 en donde NLS ha sido suprimido, el montaje de las estructuras capsómeras ocurre en el citoplasma de la célula huésped. Por lo tanto, la purificación de las capsómeras se posible a partir del citoplasma en vez de a partir del núcleo donde las proteínas intactas L1 se ensamblan dentro de las capsómeras. Las capsómeras que resultan del montaje de proteínas truncadas en donde las secuencias adicionales de aminoácidos no reemplazan a las secuencias suprimidas de proteína son necesariamente no quiméricas por naturaleza.

En aún otro aspecto de la invención, las formulaciones capsómeras para vacuna se suministran con un contenido de proteína viral truncada expresada como residuos aminoácidos adyacentes de una proteína de fusión a partir de una segunda proteína. Las proteínas virales truncadas preferidas de la invención son las proteínas virales estructurales de papiloma L1 y L2. Las capsómeras que constan de fusiones de proteína viral truncada se pueden producir utilizando juntos los componentes de la proteína L1 y L2 o solamente la proteína L1. Las capsómeras preferidas son aquellas que constan de los residuos aminoácidos de la proteína L1. Los componentes de la proteína viral truncada de las proteínas de fusión incluyen a aquellos que tienen uno o más residuos aminoácidos suprimidos del carboxi terminal de la proteína, o uno o más residuos aminoácidos suprimidos de una región interna (esto es, no a partir de cualquiera de los terminales) de la proteína. Las formulaciones preferidas de la vacuna con capsómeras contienen proteínas truncadas en el carboxi terminal. En aquellas formulaciones que incluyen a la proteína L1 derivada de HPV 16, se prefiere que se supriman de 1 a 34 residuos aminoácidos del carboxi terminal. Se contemplan también supresiones relativamente más cortas que ofrecen la ventaja de una modificación menor de las propiedades antigénicas de la proteína L1 componente de la proteína de fusión y de las capsómeras formadas a partir de allí. Se prefiere más, sin embargo, que los 34 residuos aminoácidos sean suprimidos de la secuencia de L1, correspondiente a los aminoácidos 472 a 505 en HPV 16 expuestos en la SEQ ID NO: 2, y codificados por la secuencia de polinucleótidos correspondiente a los nucleótidos 1414 a 1516 en la secuencia de codificación de L1 del HPV 16 expuesta en la SRQ ID NO: 1. Cuando la formulación de la vacuna consta de capsómeras elaboradas con proteínas que sufren una supresión interna, se prefiere que la secuencia de aminoácidos suprimida contenga a la región nuclear de localización, o a la secuencia, de la proteína.

Los aminoácidos de la segunda proteína se pueden derivar de numerosas fuentes mientras que la adición de los residuos aminoácidos de la segunda proteína a la primera proteína permite la formación de capsómeras. Preferiblemente, la adición de los residuos aminoácidos de la segunda proteína inhibe la habilidad de la proteína viral intacta para formar estructuras de partículas tipo virus; más preferiblemente, los residuos aminoácidos de la segunda proteína promueven la formación de capsómeras. Los residuos aminoácidos de la segunda proteína se pueden derivar a partir de numerosas fuentes, incluidos los residuos aminoácidos de la primera proteína. En una modalidad de la invención, la segunda proteína puede ser cualquier antígeno tumoral humano, antígeno viral, hubo antígeno bacteriano que sea importante en la estimulación de una respuesta inmune en estados neoplásicos o infecciosos de la enfermedad. En una modalidad preferida, la segunda proteína es también una proteína del virus de papiloma. Se prefiere también que la segunda proteína sea el producto de la expresión del gen temprano del virus de papiloma. Se prefiere también, sin embargo, que la segunda proteína sea seleccionada del grupo de E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 - productos génicos tempranos codificados en el genoma de las cepas del virus de papiloma HPV6, HPV11, HPV18, HPV33, HPV35 o HPV45. Se prefiere más que la segunda proteína sea codificada por el gen E7 del HPV16, el marco de lectura abierta que se expone en la SEQ ID NO: 3. Las capsómeras reunidas a partir de las subunidades de la proteína de fusión son mencionadas aquí como capsómeras quiméricas. En una modalidad, la formulación de la vacuna de la invención contiene capsómeras quiméricas en donde los residuos aminoácidos de la proteína L1 constituyen aproximadamente de 50 a 99% de los residuos totales de aminoácidos de la proteína de fusión. En otra modalidad, los residuos aminoácidos de L1 constituyen aproximadamente de 60 a 90% de los residuos totales de aminoácidos de la proteína de fusión; en una modalidad particularmente preferida, los aminoácidos de L1 constituyen aproximadamente el 80% de los residuos aminoácidos de la proteína de fusión.

En una modalidad preferida de la invención, las proteínas de las formulaciones de la vacuna se producen por medio de metodologías recombinantes. En las formulaciones que contienen proteínas virales truncadas, las proteínas se pueden aislar a partir de las fuentes naturales como proteínas intactas y se las hidroliza *in vitro* utilizando hidrólisis

química o digestión enzimática con cualquiera entre un gran número de proteasas específicas o generales, posteriormente se modifica la proteína truncada para incluir residuos aminoácidos adicionales como se describió anteriormente para suministrar una proteína de fusión truncada de la invención.

5 En la producción de capsómeras, se pueden utilizar las técnicas de biología molecular recombinante para producir ADN que codifique ya sea a la proteína truncada deseada, o a la proteína de fusión truncada. Las metodologías recombinantes requeridas para producir un ADN que codifique a una proteína deseada son bien conocidas y practicadas rutinariamente en el arte. Los manuales de laboratorio, por ejemplo Sambrook, y colaboradores (eds), MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, NY (1989) y Ausubel y colaboradores (eds), PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1997), describen en detalle las técnicas necesarias para llevar a cabo las manipulaciones requeridas del ADN. Para la producción a gran escala de capsómeras quiméricas, la expresión de la proteína se puede llevar a cabo utilizando ya sea de vectores virales o eucariotas. Los vectores preferidos incluyen a cualquiera de los bien conocidos vectores de expresión de procariotas, a baculovirus recombinantes, a vectores específicos de las células COS, a vacuna recombinantes, o a construcciones de expresión específicas para levadura. Cuando se utilizan proteínas recombinantes para proveer capsómeras de la invención, se pueden aislar primero las proteínas de la célula huésped de su expresión y después incubarlas bajo condiciones que permitan que ellas mismas se ensamblen para proveer capsómeras. Alternativamente, las proteínas se pueden expresar bajo condiciones en donde las capsómeras se forman en la célula huésped.

20 La invención también contempla procesos para producir capsómeras de las formulaciones de la vacuna. En un método, las proteínas L1 se expresan a partir del ADN que codifica seis histidinas adicionales en el carboxi terminal de la secuencia que codifica a la proteína L1. Las proteínas L1 expresadas con histidinas adicionales (proteínas L1 His) se expresan más preferiblemente en *E. coli* y las proteínas L1 His se pueden purificar utilizando cromatografía de afinidad con níquel. Las proteínas L1 His en lisado celular se suspenden en un amortiguador para desnaturalización, por ejemplo, clorhidrato de guanidina 6 M hubo un amortiguador de capacidad de desnaturalización equivalente, y luego se las somete a cromatografía con níquel. La proteína eluida a partir de la etapa de cromatografía con níquel se renaturaliza, por ejemplo en NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Tritón-X 100 al 0,01%, HEPES 10 mM (ácido 2-hidroxietil piperazina-N<sup>1</sup>-2 etano sulfónico), pH 7,4. De acuerdo a un método preferido de la invención, el montaje de capsómeras tiene lugar después de la diálisis de las proteínas purificadas, preferiblemente después de la diálisis contra NaCl 150 mM, Ca<sup>2+</sup> 25 mM, DMSO al 10% (dimetil sulfóxido), Tritón-X 100 al 0,1%, Tris 10 mM [tris-(hidroximetil) amino- metano] ácido acético con un valor de pH de 5,0.

La formación de capsómeras puede ser monitoreada por medio de un microscopio electrónico, y, en los casos en donde las capsómeras se componen de proteínas de fusión, la presencia de diferentes componentes de proteína en la capsómera armada se puede confirmar por medio de análisis de transferencias de Western utilizando antisuero específico.

De acuerdo con la presente invención, se proveen formulaciones para vacuna para uso en tratamiento terapéutico de individuos infectados con HPV. El uso de formulaciones para vacuna también provee un tratamiento profiláctico para individuos susceptibles a la intención por HPV. Mientras que los individuos infectados pueden ser identificados fácilmente utilizando técnicas estándar de diagnóstico, los individuos susceptibles se pueden identificar, por ejemplo, como aquellos comprometidos en relaciones sexuales con un individuo infectado. Sin embargo, debido a la alta frecuencia de infección con HPV, todas las personas sexualmente activas son susceptibles de infección por el virus de papiloma.

45 La administración de una formulación para vacuna puede incluir uno o más componentes adicionales tales como excipientes farmacéuticos aceptables, diluyentes, adyuvantes, y/o amortiguadores. Las vacunas se pueden administrar una sola vez o en múltiples ocasiones. La formulación para la vacuna de la invención se puede suministrar a través de diferentes rutas de administración incluidas, por ejemplo, oral, intravenosa, intramuscular, nasal, rectal, transdérmica, vaginal, subcutánea, e intraperitoneal.

Las formulaciones para vacuna de la invención ofrecen numerosas ventajas cuando se las compara con preparaciones convencionales para vacuna. Como parte de una vacunación terapéutica, las capsómeras puede promover la eliminación de células persistentemente infectadas en, por ejemplo, pacientes con CIN o carcinoma cervical. Adicionalmente, las vacunaciones terapéuticas de este tipo pueden servir también para un propósito profiláctico en la protección de pacientes con lesiones CIN, de infectarse nuevamente. Como una ventaja adicional, las capsómeras pueden evitar la neutralización por medio de anticuerpos anticápside previamente existentes y por lo tanto poseen una vida media en circulación más larga en comparación con partículas quiméricas tipo virus.

60 Las formulaciones para vacuna que comprenden capsómeras quiméricas pueden proveer una ventaja adicional de antigenicidad incrementada de ambos componentes proteicos de la proteína de fusión a partir de los cuales se forma la capsómera. Por ejemplo, en una VLP, los componentes de la proteína de la capsómera subyacente se pueden insertar en la estructura total como resultado del posicionamiento internalizado dentro de las mismas VLP. En forma similar, los epítomos de los componentes de la proteína se pueden obstruir estéricamente como resultado del contacto capsómera con capsómera, y por lo tanto se hacen inaccesibles para producir una respuesta inmune. Los resultados preliminares utilizando proteínas de fusión L1/E7 para producir las VLP soportan esta posición en que no se detectó respuesta al anticuerpo contra el componente E7. Esta observación es consistente con los resultados previos que indican que la región carboxi terminal de L1 forma estructuras de brazo interpentaméricas que permiten el montaje de capsómeras

dentro de cápsides [García y colaboradores, *J. Virol.* 71:2988-2995 (1997)]. Presumiblemente en la estructura capsómera quimérica, ambos componentes proteicos de la subestructura de la proteína de fusión son accesibles para evocar una respuesta inmune. Las vacunas que contienen capsómera ofrecerían por lo tanto la ventaja adicional de una antigenicidad mayor contra cualquier componente proteico, incluido, por ejemplo, los epítomos de neutralización de otras proteínas virales, expresadas como una fusión con las secuencias de aminoácidos de L1.

### Descripción detallada de la invención

La presente intención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos. El Ejemplo 1 describe la construcción de vectores de expresión para producir proteínas virales, quiméricas o de fusión. El Ejemplo 2 se relaciona con la generación de baculovirus recombinantes para la expresión de proteínas virales. El Ejemplo 3 se relaciona con la purificación de capsómeras. El Ejemplo 4 describe un protocolo de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales y de antisuero. El Ejemplo 5 provee un ELISA de un péptido para cuantificar la formación de capsómeras. El Ejemplo 6 describe un ELISA de captura de antígeno para cuantificar la formación de capsómeras. El Ejemplo 7 provee un ensayo de hemaglutinina para analizar la inducción de anticuerpos neutralizantes.

#### Ejemplo 1

##### *Construcción de Genes Quiméricos L1*

Se cortó el ADN que codifica al marco de lectura abierta de L1 de HPV 16 del plásmido 16-114/k-L1/L2-pSynxVI<sup>-</sup> [Kirnbauer y colaboradores, *J. Virol.* 67:6929-6936 (1994)] utilizando *Bgl*II y al fragmento resultante subclonado dentro de pUC19 (New England Biolabs. Beverly, MA) previamente linealizado en el único sitio de restricción *Bam*HI. Se generaron primero dos construcciones básicas de expresión para permitir la inserción posterior de ADN para permitir la expresión de la proteína de fusión. Una construcción codificada HPV16 L1Δ310 que tiene una supresión de nueve aminoácidos: se sabía que la región suprimida mostraba bajo nivel de homología con todas las otras proteínas L1 de virus de papiloma. La segunda construcción, HPV 16 L1 ΔC, codificó una proteína que tenía una supresión de 34 aminoácidos de los residuos del carboxi terminal de L1. Otras construcciones incluyen un sitio de restricción *Eco*RV en la posición de la supresión para una inserción más fácil de ADN que codifica otras secuencias de proteína. La adición del sitio *Eco*RV codifica dos aminoácidos de una proteína no L1, aspartato y isoleucina.

##### *A. Generación de una construcción para la expresión de HPV 16 L1Δ310*

Se diseñaron dos iniciadores (las SEQ ID NO: 5 y 6) para amplificar al vector pUC19 y la secuencia de codificación completa de HPV 16 L1, excepto los nucleótidos 916 a 942 en la SEQ ID NO: 1. Los iniciadores se sintetizaron para introducir también un sitio único de restricción *Eco*RV (subrayado en las SEQ ID NO: 5 y 6) en los terminales del producto de amplificación.

CCCCGATATCGCCTTTAATGTATAAATCGTCTGG  
CCCCGATATCTCAAATTATTTTCTACACCTAGTG

SEQ ID NO: 5  
SEQ ID NO: 6

Se digirió el producto PCR resultante con *Eco*RV para proveer extremos complementarios y se hizo un círculo con el producto de digestión por medio de ligación. El ADN ligado fue transformado dentro de *E. coli* utilizando técnicas estándar y se seleccionaron los plásmidos de las colonias resultantes por la presencia de un sitio de restricción *Eco*RV. Se identificó que un clon designado como HPV 16 L1 Δ310 tenía la supresión apropiada de veintisiete nucleótidos y se utilizó esta construcción para insertar fragmentos de ADN que codifican a otras proteínas HPV 16 en el sitio *Eco*RV como se discute más adelante.

##### *B. Generación de construcciones para la expresión de HPV 16 L1 ΔC*

Se designaron dos iniciadores (las SEQ ID NO: 7 y 8) complementarios al marco de lectura abierta de HPV 16 L1 de tal manera que los iniciadores colindaban entre sí para permitir la amplificación en direcciones inversas sobre el ADN molde que contiene secuencias que codifican a HPV16 L1 en el pUC19 anteriormente descrito.

AAAGATATCTTGTAGTAAAAATTTGCGTCCTAAAGGAAAC  
AAAGATATCTAATCTACCTCTACAACGCTAAACGCAAAAAACG

SEQ ID NO: 7  
SEQ ID NO: 8

Cada iniciador introdujo un sitio de restricción *Eco*RV en el terminal del producto de amplificación. En el iniciador secuencia abajo (SEQ ID NO: 8), el sitio *Eco*RV fue seguido por un codón de detención translacional TAA posicionado de tal manera que el producto de amplificación, por ligación de los extremos de *Eco*RV para convertirlo en circular, incluirían supresión de los 34 aminoácidos carboxi terminales de L1. La PCR fue realizada para amplificar al marco de lectura abierta parcial de L1 y al vector completo. El producto de amplificación fue escindido con *Eco*RV, se lo hizo circular con T4 ADN ligasa, y de lo transformó dentro de células DH5 α de *E. coli*. Se analizaron los plásmidos de los clones viables por la presencia de un sitio *Eco*RV que linealizaría al plásmido. Se identificó una construcción positiva designada pUCHPV16L1ΔC y se la utilizó para insertar ADN de otras proteínas HPV 16 utilizando el sitio *Eco*RV.

## ES 2 280 104 T3

### C. Inserción de fragmentos de ADN dentro de HPV 16 L1 Δ310 y de HPV16L1ΔC

Los fragmentos de ADN de HPV 16 E7 que codifican a los aminoácidos 1-50, 1-60, 1-98, 25-75, 40-98, 50-98 en la SEQ ID NO: 4 fueron amplificados utilizando iniciadores que introdujeron los sitios de restricción *EcoRV* en el terminal 5' con el propósito de facilitar la inserción del fragmento ya sea dentro de la secuencia modificada de HPV 16 L1 Δ310 o de HPV16L1ΔC. En las diferentes reacciones de amplificación, se utilizó el iniciador E7.1 (SEQ ID NO: 9) en combinación con el iniciador E7.2 (SEQ ID NO: 10) para generar un fragmento de ADN que codifica a los aminoácidos 1-50 de E7; con el iniciador E7.3 (SEQ ID NO: 11) para generar un fragmento de ADN que codifica a los aminoácidos 1-60 de E7; o con el iniciador E7.4 (SEQ ID NO: 12) para generar un fragmento de ADN que codifica a los aminoácidos 1-98 de E7. En otras reacciones de amplificación, se utilizaron los pares de iniciadores E7.5 (SEQ ID NO: 13) y E7.6 (SEQ ID NO: 14) para amplificar un fragmento de ADN que codifica a los aminoácidos 25-75 de E7; E7.7 (SEQ ID NO: 15) y E7.4 (SEQ ID NO: 12) fueron utilizados para amplificar un fragmento de ADN que codifica a los aminoácidos 40-98 de E7; y E7.8 (SEQ ID NO: 16) y E7.4 (SEQ ID NO: 12) fueron utilizados para amplificar un fragmento de ADN que codifica a los aminoácidos 50-98 de E7.

Iniciador E7.1 SEQ ID NO: 9

AAAAGATATCATGCATGGAGATACACCTACATTGC

Iniciador E7.2 SEQ ID NO: 10

TTTTGATATCGGCTCTGTCCGGTTCTGCTTGCTCC

Iniciador E7.3 SEQ ID NO: 11

TTTTGATATCCTTGCAACAAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCC

Iniciador E7.4 SEQ ID NO: 12

AAAAGATATCTGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCAC

Iniciador E7.5 SEQ ID NO: 13

TTTTGATATCGATTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAG

Iniciador E7.6 SEQ ID NO: 14

TTTTGATATCGTCTACGTGTGTGCTTTGTACGCAC

Iniciador E7.7 SEQ ID NO: 15

TTTATCGATATCGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGAC

Iniciador E7.8 SEQ ID NO: 16

TTTTGATATCGATGCCCATTTACAATATTGTAACCTTTTG

En forma similar, se amplificaron los nucleótidos del ADN que codifica a la proteína de la matriz de influenza (SEQ ID NO: 17) utilizando el par iniciador expuesto en las SEQ ID NO: 19 y 20. Ambos iniciadores introdujeron un sitio de restricción *EcoRV* en el producto de amplificación.

TTTTGATATCGATATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATC

SEQ ID NO: 19

TTTTGATATCGTTGTTTGGATCCCCATTCCCATTTG SEQ

ID NO: 20

Se escindieron los productos PCR de cada reacción de amplificación con *EcoRV* y se los insertó dentro del sitio *EcoRV* de cualquiera de las secuencias HPV 16 L1 Δ310 y HPV16L1ΔC previamente linealizadas con la misma enzima. Con el propósito de determinar la orientación de los insertos en los plásmidos que codifican a los aminoácidos 25-75 y 50-98 de E7 y al plásmido que incluye a la proteína de la matriz de influenza, se empleó digestión con *Clal*, tomando ventaja de un sitio de restricción que se superpone al recientemente creado sitio de restricción *EcoRV* (GATATCGAT) y que está incluido en el iniciador secuencia arriba. Para las tres construcciones de expresión que incluyen a la metionina de iniciación de HPV 16 E7, se determinó la orientación del inserto utilizando un sitio de restricción *NsiI* dentro de la región de codificación de E7.

Una vez que las construcciones de expresión que tienen a los insertos apropiados fueron identificadas, se cortó la región de codificación de la proteína tanto para L1 como para los aminoácidos insertados como una unidad que utiliza enzimas de restricción *XbaI* y *SmaI* y el ADN aislado ligado dentro del plásmido pVL1393 (Invitrogen) para generar baculovirus recombinantes.

## ES 2 280 104 T3

### D. Eliminación de los Sitios de Restricción *EcoRV* en Construcciones para Expresión

La secuencia de HPV 16 L1  $\Delta$ C incluye ADN del sitio *EcoRV* que resulta en la traducción de los aminoácidos que no se encuentran normalmente en polipéptidos L1 de tipo silvestre. Por lo tanto, se diseñó una serie de construcciones para expresión en la cuales el sitio artificial *EcoRV* fue eliminado. La secuencia de L1 para esta serie de construcciones de expresión fue designada como HPV16L1 $\Delta$ C\*.

Para generar una construcción para expresión que contenga a la secuencia HPV 16L1 $\Delta$ C\*, se llevaron a cabo dos reacciones PCR para amplificar dos fragmentos que se superponen a partir del pUC-HPV16 L1 $\Delta$ C que codifica a los aminoácidos 1-50 de E7. Los fragmentos de ADN resultantes se superpusieron en la posición del límite entre L1/E7 pero no contenían a los dos sitios de restricción *EcoRV*. El fragmento 1 se generó utilizando a los iniciadores P1 (SEQ ID NO: 21) y P2 (SEQ ID NO: 22) y al fragmento 2 utilizando los iniciadores

P3 (SEQ ID NO: 23) y P4 (SEQ ID NO: 24).

Iniciador P1 SEQ ID NO: 21

GTTATGACATACATACATTCTATG

Iniciador P2 SEQ ID NO: 22

CCATGCATTCCTTGCTTAGTAAAAATTTGCGTCC

Iniciador P3 SEQ ID NO: 23

CTACAAGCAGGAATGCATGGAGATACACC

Iniciador P4 SEQ ID NO: 24

CATCTGAAGCTTAGTAATGGGCTCTGTCCGGTTCTG

Después de las primeras dos reacciones de amplificación, se utilizaron los dos productos purificados como moldes en otra reacción PCR utilizando únicamente a los iniciadores P1 y P4. El producto de amplificación resultante fue digerido con las enzimas *EcoNI* y *HindIII* insertadas en la construcción para expresión de HPV 16L1 $\Delta$ C descrita anteriormente después de la digestión con las mismas enzimas. La construcción resultante para expresión difiere de la construcción original HPV16L1 $\Delta$ C con ADN que codifica a los aminoácidos 1-50 de L1 y de E7 por la pérdida de los dos sitios de restricción internos de *EcoRV*. El primer sitio *EcoRV* fue reemplazado por ADN que codifica a los aminoácidos nativos alanina y glicina de L1 en esta posición y el segundo fue reemplazado por una señal translacional de detención. Además, la construcción para expresión, designada como HPV 16 L1 $\Delta$ C\* E7 1-52, contenía los primeros 52 aminoácidos de HPV 16 E7 como resultado del uso del iniciador P4 que también codifica a los residuos aminoácidos de E7 histidina en la posición 51 y tirosina en la posición 52. Se utilizó entonces HPV 16 L1 $\Delta$ C\* E7 1-52 para generar construcciones adicionales para expresión de HPV 16 L1 $\Delta$ C que incluyen además ADN que codifica a los aminoácidos 1-55 de E7 utilizando al iniciador P1 (SEQ ID NO: 21) en combinación con el iniciador P5 (SEQ ID NO: 25), a los aminoácidos 1-60 de E7 con el par iniciador P1 y P6 (SEQ ID NO: 26), a los aminoácidos 1-65 de E7 con el par iniciador P1 y P7 (SEQ ID NO: 27). Las secuencias adicionales de ADN que codifican a los aminoácidos en los productos de amplificación surgen del diseño de los iniciadores para incluir nucleótidos adicionales para los aminoácidos deseados.

Iniciador P5 SEQ ID NO: 25

CATCTGAAGCTTAAGCAATATTGTAATGGGCTCTGTCCG

Iniciador P6 SEQ ID NO: 26

CATCTGAAGCTTACTTGCAACAAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCTCTGTCCG

Iniciador P7 SEQ ID NO: 27

CATCTGAAGCTTAAAGCGTAGAGTCACACTTGCAACAAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCTCTGTCCG

En forma similar, HPV 16 L1 $\Delta$ C\* E7 1-70 fue generado utilizando el molde de ADN que codifica a HPV 16 L1 $\Delta$ C\* E7 1-66 y al par iniciador P1 y P8 (SEQ ID NO: 28).

Iniciador P8 SEQ ID NO: 28

CATCTGAAGCTTATTGTACGCACAACCGAAGCGTAGAGTCACACTTG

## ES 2 280 104 T3

Después de cada reacción PCR, se digirieron los productos de amplificación con *Eco*NI y *Hind*III y se los insertó dentro de HPV16L1ΔC previamente digerido con las mismas enzimas. Se determinaron las secuencias de cada una de las construcciones utilizando un instrumento para secuenciación modelo Prism 377 de Applied Biosystems con dideoxinucleótidos fluorescentes en la cadena terminal [Prober y colaboradores, *Science* 238:336-341 (1987)].

### Ejemplo 2

#### Generación de Baculovirus Recombinantes

Las células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) se cultivaron en suspensión o en cultivos monocapa a 27° en medio TNMFH (Sigma) suplementado con suero fetal de ternera al 10% y glutamina 2 mM. Para la construcción recombinante de baculovirus con base en HPV 16 L1, se transfectaron células Sf9 con 10 μg de plásmido de transferencia junto con 2 μg de Baculo-Gold DNA (PharMingen, San Diego, CA) linealizado. Se purificaron los virus recombinantes de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante.

Para analizar la expresión de la proteína HPV 16 L1, se infectaron 10<sup>5</sup> células Sf9 con baculovirus recombinante con una multiplicidad de infección (m.o.i) de 5 a 10. Después de incubación durante tres a cuatro días a 28°C, se removió el medio y se lavaron las células con PBS. Se lisaron las células en amortiguador SDS para la muestra y se las analizó por medio de SDS-PAGE y de transferencias de Western utilizando anticuerpos anti-HPV16 L1 y anti-HPV16 E7.

Con el propósito de determinar cuál de las construcciones para la expresión de la proteína quimérica L1 produciría preferencialmente capsómeras, se sometieron los extractos de las células transfectadas a centrifugación por gradiente. Las fracciones obtenidas del gradiente fueron analizadas por el contenido de proteína L1 por medio de transferencias de Western y de la formación de VLP a través de microscopía electrónica. Los resultados se observan en la Tabla 1.

La proteína intacta HPV L1, así como los productos de expresión HPV 16 L1Δ310 y HPV 16 L1ΔC, se observó que cada uno de ellos produce capsómeras y partículas tipo virus en iguales proporciones. Cuando las secuencias de codificación E7 fueron insertadas dentro del vector HPV 16 L1Δ310, únicamente las proteínas de fusión que incluían a los aminoácidos producidos 1 a 50 de E7 dieron lugar a la formación detectable de capsómeras.

Cuando el AND que codifica a E7 fue insertado dentro del vector HPV 16 L1ΔC, se encontró que todas las proteínas de fusión producían capsómeras; las proteínas quiméricas que incluyen los residuos aminoácidos 40-98 de E7 produjeron el nivel más alto de estructuras capsómeras exclusivamente. Las proteínas quiméricas que incluyen a los aminoácidos 1-98 y 25-75 de E7 produjeron ambas capsómeras en forma predominante, aunque también se observó la formación de partículas tipo virus. La proteína quimérica que incluye a los aminoácidos 1-60 de E7 resultó en niveles casi iguales de capsómeras y en la producción de partículas tipo virus.

Cuando se insertaron las secuencias de E7 dentro del vector HPV 16 L1ΔC vector, se observó que todas las proteínas de fusión producían capsómeras. La inserción de ADN que codifica a los residuos 1-52, 1-55, y 1-60 de E7 produjo el nivel más alto de capsómeras, pero se observaron niveles iguales en la producción de partículas tipo virus. Mientras que la inserción de ADN que codifica a los residuos 1-65, 1-70, 25-75, 40-98, y 1-98 de E7 resultó en niveles comparativamente más bajos o en niveles indetectables de cápside, se produjeron capsómeras en cantidades altas.

TABLA 1

| Capacidad para la Formación de Capsómera y de Cápside de Proteínas Quiméricas HPV L1 |          |                         |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------|-----------------------|
| Construcción para la Expresión de L1                                                 | Inserto  | Producción de Capsómera | Producción de Cápside |
| HPV 16L1                                                                             | Ninguno  | +++++                   | +++++                 |
| HPV 16L1Δ310                                                                         | Ninguno  | +++                     | ++                    |
| HPV 16L1ΔC                                                                           | Ninguno  | ++++                    | ++++                  |
| HPV 16L1Δ310                                                                         | E7 1-98  | -                       | -                     |
| HPV 16L1Δ310                                                                         | E7 1-50  | ++                      | -                     |
| HPV 16L1Δ310                                                                         | E7 25-75 | -                       | -                     |
| HPV 16L1Δ310                                                                         | E7 50-98 | -                       | -                     |
| HPV 16L1ΔC                                                                           | E7 1-98  | +++                     | +                     |
| HPV 16L1ΔC                                                                           | E7 25-75 | +++                     | +                     |

## ES 2 280 104 T3

(continuación)

| Capacidad para la Formación de Capsómera y de Cápside de Proteínas Quiméricas HPV L1 |           |                         |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------|-----------------------|
| Construcción para la Expresión de L1                                                 | Inserto   | Producción de Capsómera | Producción de Cápside |
| HPV 16L1ΔC                                                                           | E7 50-98  | +                       | +                     |
| HPV 16L1ΔC                                                                           | E7 1-60   | +++++                   | +++++                 |
| HPV 16L1ΔC                                                                           | E7 40-98  | ++++                    | -                     |
| HPV 16L1ΔC                                                                           | Influenza | +++                     | +                     |
| HPV 16L1Δ*C                                                                          | E7 1-52   | +++++                   | +++++                 |
| HPV 16L1Δ*C                                                                          | E7 1-55   | +++++                   | +++++                 |
| HPV 16L1Δ*C                                                                          | E7 1-60   | +++                     | ++++                  |
| HPV 16L1Δ*C                                                                          | E7 1-65   | ++                      | -                     |
| HPV 16L1Δ*C                                                                          | E7 1-70   | ++                      | -                     |

### Ejemplo 3

#### Purificación de Capsómeras

Las células High Five de *Trichopulsia ni* (TN) se desarrollaron hasta una densidad aproximadamente de  $2 \times 10^6$  células/ml en medio libre de suero Ex-Cell 405 (JRH Biosciences). Se precipitaron aproximadamente  $2 \times 10^8$  células por medio de centrifugación a  $1000 \times g$  durante 15 minutos, se las resuspendió en 20 ml de medio, y se las infectó con baculovirus recombinantes con una m.o.i de 2 a 5 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la adición de 200 ml de medio, se sembraron las células en placa y se las incubó durante 3 a 4 días a  $27^\circ\text{C}$ . Después de la incubación, se recogieron las células, se las precipitó y resuspendió en 10 ml de amortiguador de extracción.

Se llevaron a cabo las siguientes etapas a  $4^\circ\text{C}$ . Se sonicaron las células durante 45 segundos a 60 watts y el lisado celular resultante fue centrifugado a 10.000 rpm en un rotor Sorval SS34. Se removió el sobrenadante y se lo guardó mientras se resuspendía el precipitado resultante en 6 ml de amortiguador para extracción, sonificado durante 3 segundos adicionales a 60 watts, y se lo centrifugó nuevamente. Se combinaron los dos sobrenadantes, se los colocó en capas sobre un gradiente en dos etapas que contenía 14 ml de sacarosa al 40% en la parte superior de 8 ml de una solución CsCl (4,6 g de CsCl por 8 ml en amortiguador para extracción), y se centrifugó en un rotor de contenedores basculantes Sorval AH629 durante 2 horas a 27.000 rpm y a  $10^\circ\text{C}$ . La región de interfase entre el CsCl y la sacarosa, junto con la capa completa de CsCl fueron recolectadas en tubos Quickseal de 13,4 ml (Beckman) y se añadió amortiguador para extracción para ajustar el volumen a 13,4 ml. Se centrifugaron las muestras durante la noche a 50.000 rpm y a  $20^\circ\text{C}$  en un rotor Beckman 70 TI. Se fraccionaron los gradientes (1 ml por fracción) haciéndole punción a los tubos en la parte superior y en la parte inferior con una aguja calibre 21. Se recolectaron las fracciones de cada tubo y se analizaron  $2,5 \mu\text{l}$  de cada fracción por medio de un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y transferencias de Western utilizando un anticuerpo anti-HPV16L1.

Se separaron las partículas tipo virus y las capsómeras de las fracciones identificadas anteriormente por medio de sedimentación sobre gradientes de sacarosa entre el 10 y el 50%. Se recolectaron las fracciones poco de los gradientes de CsCl y se las dializó durante 2 horas contra HEPES 5 mM (pH 7,5). Se utilizó la mitad del dializado para producir capsómeras desarmando las VLP intactas durante noche por medio de la adición de EDTA (concentración final 50 mM), EGTA (50 mM), DTT (30 mM), NaCl (100 mM), y Tris/HCl, pH 8,0 (10 mM). Como control, se añadieron únicamente NaCl y Tris/HCl a la otra mitad.

Para el análisis de las capsómeras producidas a partir de las VLP desarmadas, se añadieron EDTA, EGTA, y DTT (concentración final 5 mM cada una) a los cojines de sacarosa que fueron centrifugados a  $250.000 \times g$  durante 2 a 4 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Se recolectaron las fracciones por medio de la punción de los tubos por la parte inferior. Se analizó entonces una dilución 1:10 de cada fracción por medio de la captura de antígeno por ELISA.

### Ejemplo 4

#### Protocolo de Inmunización para la Producción de Antisueros Policlonales y de Anticuerpos Monoclonales

Los ratones Balb/c se inmunizan en forma subcutánea tres veces, cada cuatro semanas aproximadamente con 60  $\mu\text{g}$  de capsómeras quiméricas de HPV mezcladas 1:1 con Adyuvantes incompletos de Freund en un volumen total de

## ES 2 280 104 T3

100  $\mu$ l. Seis semanas después de la tercera inmunización, se sacrifican los ratones y se recolecta la sangre por medio de punción cardiaca.

### Ejemplo 5

#### ELISA de un Péptido para Cuantificar la Formación de Capsómeras

Las placas de microtitulación (Dynatech) se recubren durante la noche con 50  $\mu$ l de péptido E701 [Muller y colaboradores, 1982] a una concentración de 10  $\mu$ g/ml en PBS. Los pozos se bloquean durante dos horas a 37°C con 100  $\mu$ l de amortiguador que contiene BSA al 5% y Tween 20 en PBS al 0,05% y se los lavó tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Después del tercer lavado, se añaden 50  $\mu$ l de suero diluido 1:5000 en BSA/Tween 20/PBS a cada pozo y se lleva a cabo una incubación durante 1 hora. Se lavan nuevamente las placas como anteriormente y se añaden 50  $\mu$ l de conjugado de peroxidasa antirratón de cabra a una dilución 1:5000. Después de 1 hora, se lavan las placas y se las colorea utilizando sustrato ABTS (0,2 mg/ml, ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzthiazolina- $\beta$ -sulfónico en amortiguador de fosfato-acetato de Na 0,1 M (pH 4,2) con 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por 10 ml). La extinción se midió después de 1 hora a 490 nm en un lector de placas automatizado de Dynatech.

### Ejemplo 6

#### ELISA de Captura de Antígeno para Cuantificar la Formación de Capsómeras

Para permitir la cuantificación relativa de partículas tipo virus y de capsómeras en fracciones de gradientes de CsCl, se utilizó un ELISA de captura de antígeno. Las placas de microtitulación se recubrieron durante la noche con 50  $\mu$ l/pozo de una dilución 1:500 (concentración final de 2  $\mu$ g por ml, en PBS) con una proteína A purificada de anticuerpo monoclonal de ratón inmunoespecífico para HPV 16 L1 (anticuerpos 25/C, MM07 y Ritti 1 se obtuvieron a partir de ratones inmunizados con las VLP del HPV 16). Las placas se bloquearon con leche al 5%/PBS durante 1 hora y se añadieron 50  $\mu$ l de fracciones de gradientes de CsCl durante 1 hora a 37°C utilizando una dilución 1:300 (en leche al 5%/PBS). Después de tres lavados con PBS/Tween 20 al 0,05%, se añadieron 50  $\mu$ l de un antisuero policlonal de conejo (dilución 1:3000 en leche/PBS), creado contra las VLP del HPV 16 y se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora. Se lavaron las placas nuevamente y se incubaron adicionalmente con 50  $\mu$ l de un conjugado de peroxidasa anticonejo de cabra (Sigma) diluido 1:5000 en PBS que contenía leche al 5% durante 1 hora. Después del lavado final, se colorearon las placas con sustrato ABTS durante 30 minutos y se midió la extinción a 490 nm en un lector de placas automatizado de Dynatech. Como control negativo, el ensayo incluyó también pozos recubiertos únicamente con PBS.

Para analizar los anticuerpos monoclonales por la especificidad capsómera, las VLP con EDTA/DTT para desarmar partículas. Las preparaciones de partículas tratadas fueron analizadas en el ELISA para captura de antígeno y se compararon las lecturas con controles no tratados. Para el desarmado, se incubaron 40  $\mu$ l de las VLP durante la noche a 4°C en 500  $\mu$ l de amortiguador de rotura que contiene DTT 30 mM, EGTA 50 mM, EDTA 60 mM, NaCl 100 mM, y Tris/HCl 100 mM, pH 8,0. Las alícuotas de partículas tratadas y no tratadas fueron utilizadas en el ELISA de captura anterior en una dilución 1:20-1:40.

### Ejemplo 7

#### Ensayo de Inhibición de Hemaglutinina

Con el propósito de determinar el grado en el cual las vacunas quiméricas que contienen capsómera evocan la producción de anticuerpos neutralizantes, se lleva a cabo un ensayo de inhibición de hemoaglutinación como se describe brevemente más adelante. Este ensayo se basa en observaciones previas de que las partículas tipo virus son capaces de hemoaglutinar los glóbulos rojos.

Los ratones se inmunizan con cualquier vacuna quimérica capsómera y se recolecta el suero como se describió anteriormente en el Ejemplo 4. Como controles positivos, se analizaron las partículas tipo virus HPV 16 L1 (las VLP) y las VLP de PV1 bovino (BPV) L1 en paralelo con una preparación capsómera quimérica. Para establecer una línea base positiva, las VLP de HPV16 o de BPV1 son incubadas primero con o sin suero recolectado a partir de ratones inmunizados después de lo cual se añaden glóbulos rojos. El grado en el cual la incubación previa con sueros de ratón inhibe la hemoaglutinación de glóbulos rojos es una indicación de la capacidad de neutralización de los sueros de ratón. Se repitieron entonces los experimentos utilizando capsómeras quiméricas con el propósito de determinar el efecto neutralizador de los sueros de ratón sobre la vacuna. Más adelante se describe un breve protocolo para el ensayo de inhibición de hemoaglutinación.

Se añadieron cien microlitros de heparina (1000 usp unidades/ml) a 1 ml de sangre fresca de ratón. Se lavaron tres veces los glóbulos rojos con PBS seguido por centrifugación y resuspensión en un volumen de 10 ml. Luego, se resuspendieron los eritrocitos en 0,5 ml de PBS y se los almacenó a 4°C hasta por tres días. Para el ensayo de hemaglutinina, se utilizaron 70  $\mu$ l de la suspensión por pozo sobre una placa de 96 pozos.

Las alícuotas de capsómera quimérica de los gradientes en CsCl se dializaron durante una hora contra Hepes 10 mM (pH 7,5) y se añadieron 100  $\mu$ l de diluciones seriales a la mitad en PBS a eritrocitos de ratón en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pozos que son incubadas además durante 3-16 horas a 4°C. Para la inhibición

## ES 2 280 104 T3

de la hemoaglutinación, las capsómeras se incubaron con diluciones de anticuerpos en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente y añadidos luego a los eritrocitos. El nivel de hemoaglutinación de eritrocitos, y por lo tanto la presencia de anticuerpos neutralizantes, se determina por medio de métodos estándar.

5 En los resultados preliminares, se observó que los sueros de ratón generados contra capsómeras quiméricas que contienen proteína HPV16L1ΔC en asociación con los residuos aminoácidos 1-98 de E7 inhiben la hemoaglutinación por las VLP de HPV16, pero no por las VLP de BPV. Los sueros de ratón fueron por lo tanto positivos para los anticuerpos neutralizantes contra las VPL humanas y esta neutralización diferencial fue muy probablemente el resultado de la especificidad del anticuerpo por los epítomos contra los cuales se erigieron los anticuerpos.

10 Se espera que ocurran numerosas modificaciones y variaciones en la invención como se la expone en los ejemplos ilustrativos anteriores para aquellos capacitados en el arte. Consecuentemente, únicamente aquellas limitaciones que aparecen en las reivindicaciones anexas deberían afectar a la invención.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Una formulación antigénica que comprende una capsómera del virus de papiloma humano para uso como vacuna, dicha capsómera comprendiendo una proteína de fusión que contiene una proteína truncada L1 del virus de papiloma humano adyacente a los residuos aminoácidos de una segunda proteína dicha proteína L1 y dichos aminoácidos de dicha segunda proteína posicionados para inhibir la formación de una partícula tipo virus, dicha formulación evocando una respuesta inmune que neutraliza a los viriones del virus de papiloma humano.

2. Una formulación antigénica que comprende una capsómera del virus de papiloma humano para uso como una vacuna, dicha capsómera comprendiendo una proteína truncada L1 del virus de papiloma humano que tiene una supresión de uno o más residuos aminoácidos necesarios para la formación de una partícula tipo virus, dicha formulación evocando una respuesta inmune que neutraliza a los viriones del virus de papiloma humano.

3. La formulación antigénica de acuerdo a la reivindicación 2 en donde dicha capsómera comprende una proteína de fusión que contiene una proteína truncada L1 del virus de papiloma humano adyacente a residuos aminoácidos de una segunda proteína.

4. La formulación antigénica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde la proteína está codificada en el genoma de un virus de papiloma humano seleccionado del grupo que consiste de HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV33, HPV35, y HPV45.

5. La formulación antigénica de acuerdo a la reivindicación 4 en donde el virus de papiloma humano es HPV16.

6. La formulación antigénica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 5 en donde los residuos aminoácidos carboxi terminales son suprimidos de la proteína L1.

7. La formulación antigénica de acuerdo a la reivindicación 6 en donde de 1 a 34 residuos aminoácidos carboxi terminales son suprimidos de la proteína L1.

8. La formulación antigénica de acuerdo a la reivindicación 7 en donde 34 residuos aminoácidos carboxi terminales son suprimidos de la proteína L1.

9. La formulación antigénica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 5 en donde los residuos aminoácidos amino terminales son suprimidos de la proteína L1.

10. La formulación antigénica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 5 en donde los residuos aminoácidos internos son suprimidos de la proteína L1.

11. La formulación antigénica de acuerdo a la reivindicación 10 en donde los residuos aminoácidos suprimidos de la proteína L1 comprenden una señal nuclear de localización.

12. La formulación antigénica de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde los residuos aminoácidos de la segunda proteína se derivan de una proteína del HPV.

13. La formulación antigénica de acuerdo a la reivindicación 12, en donde la proteína del HPV es una proteína temprana del HPV.

14. La formulación antigénica de acuerdo a la reivindicación 12, en donde la proteína temprana del HPV se selecciona del grupo que consiste de E1, E2, E3, E4, E5, E6, y E7.

15. El uso de la formulación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección causada por el HPV y por los desordenes relacionados con el mismo.

16. El uso de la formulación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la producción de una composición farmacéutica para la prevención de una infección causada por el HPV y por los desordenes relacionados con el mismo.

**LISTA DE SECUENCIAS**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Formulas de Vacunas que Contienen Capsómeras del Virus de Papi-  
loma Humano y Métodos de Uso

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 28

(iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:

(A) DIRECCIÓN: Marshall, O'Toole, Gerstein, Murria & Borun

(B) CALLE: 233 South Wacker Drive, 6300 Sears Tower

(C) CIUDAD: Chicago

(D) ESTADO: Illinois

(E) PAÍS: Estados Unidos de América

(F) ZIP: 60606-6402

(v) FORMA EN QUE PUEDE LEERSE EN EL COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE LA SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Williams Jr., Joseph A.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 38.659

(C) REFERENCIA/NÚMERO DEL EXPEDIENTE: 27013/34028

(ix) INFORMACIÓN DE LAS TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: 312-474-6300

(B) TELEFAX: 312-474-0448

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1518 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..1518

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

# ES 2 280 104 T3

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
|    | ATG TCT CTT TGG CTG CCT AGT GAG GCC ACT GTC TAC TTG CCT CCT GTC | 48  |
|    | Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val |     |
|    | 1 5 10 15                                                       |     |
| 5  | CCA GTA TCT AAG GTT GTA AGC ACG GAT GAA TAT GTT GCA CGC ACA AAC | 96  |
|    | Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn |     |
|    | 20 25 30                                                        |     |
| 10 | ATA TAT TAT CAT GCA GGA ACA TCC AGA CTA CTT GCA GTT GGA CAT CCC | 144 |
|    | Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro |     |
|    | 35 40 45                                                        |     |
|    | TAT TTT CCT ATT AAA AAA CCT AAC AAT AAC AAA ATA TTA GTT CCT AAA | 192 |
|    | Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys |     |
|    | 50 55 60                                                        |     |
| 15 | GTA TCA GGA TTA CAA TAC AGG GTA TTT AGA ATA CAT TTA CCT GAC CCC | 240 |
|    | Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro |     |
|    | 65 70 75 80                                                     |     |
| 20 | AAT AAG TTT GGT TTT CCT GAC ACC TCA TTT TAT AAT CCA GAT ACA CAG | 288 |
|    | Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln |     |
|    | 85 90 95                                                        |     |
|    | CGG CTG GTT TGG GCC TGT GTA GGT GTT GAG GTA GGT CGT GGT CAG CCA | 336 |
|    | Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro |     |
|    | 100 105 110                                                     |     |
| 25 | TTA GGT GTG GGC ATT AGT GGC CAT CCT TTA TTA AAT AAA TTG GAT GAC | 384 |
|    | Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp |     |
|    | 115 120 125                                                     |     |
| 30 | ACA GAA AAT GCT AGT GCT TAT GCA GCA AAT GCA GGT GTG GAT AAT AGA | 432 |
|    | Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg |     |
|    | 130 135 140                                                     |     |
|    | GAA TGT ATA TCT ATG GAT TAC AAA CAA ACA CAA TTG TGT TTA ATT GGT | 480 |
|    | Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly |     |
|    | 145 150 155 160                                                 |     |
| 35 | TGC AAA CCA CCT ATA GGG GAA CAC TGG GGC AAA GGA TCC CCA TGT ACC | 528 |
|    | Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr |     |
|    | 165 170 175                                                     |     |
| 40 | AAT GTT GCA GTA AAT CCA GGT GAT TGT CCA CCA TTA GAG TTA ATA AAC | 576 |
|    | Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn |     |
|    | 180 185 190                                                     |     |
| 45 | ACA GTT ATT CAG GAT GGT GAT ATG GTT GAT ACT GGC TTT GGT GCT ATG | 624 |
|    | Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met |     |
|    | 195 200 205                                                     |     |
|    | GAC TTT ACT ACA TTA CAG GCT AAC AAA AGT GAA GTT CCA CTG GAT ATT | 672 |
|    | Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile |     |
|    | 210 215 220                                                     |     |
| 50 | TGT ACA TCT ATT TGC AAA TAT CCA GAT TAT ATT AAA ATG GTG TCA GAA | 720 |
|    | Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu |     |
|    | 225 230 235 240                                                 |     |
| 55 | CCA TAT GGC GAC AGC TTA TTT TTT TAT TTA CGA AGG GAA CAA ATG TTT | 768 |
|    | Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe |     |
|    | 245 250 255                                                     |     |
|    | GTT AGA CAT TTA TTT AAT AGG GCT GGT GCT GTT GGT GAA AAT GTA CCA | 816 |
|    | Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro |     |
|    | 260 265 270                                                     |     |
| 60 | GAC GAT TTA TAC ATT AAA GGC TCT GGG TCT ACT GCA AAT TTA GCC AGT | 864 |
|    | Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser |     |
| 65 |                                                                 |     |

# ES 2 280 104 T3

|    | 275                                                                                                                                                   | 280 | 285 |      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| 5  | TCA AAT TAT TTT CCT ACA CCT AGT GGT TCT ATG GTT ACC TCT GAT GCC<br>Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala<br>290 295 300     |     |     | 912  |
| 10 | CAA ATA TTC AAT AAA CCT TAT TGG TTA CAA CGA GCA CAG GGC CAC AAT<br>Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn<br>305 310 315 320 |     |     | 960  |
| 15 | AAT GGC ATT TGT TGG GGT AAC CAA CTA TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACT<br>Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr<br>325 330 335     |     |     | 1008 |
| 20 | ACA CGC AGT ACA AAT ATG TCA TTA TGT GCT GCC ATA TCT ACT TCA GAA<br>Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu<br>340 345 350     |     |     | 1056 |
| 25 | ACT ACA TAT AAA AAT ACT AAC TTT AAG GAG TAC CTA CGA CAT GGG GAG<br>Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Gly Tyr Leu Arg His Gly Glu<br>355 360 365     |     |     | 1104 |
| 30 | GAA TAT GAT TTA CAG TTT ATT TTT CAA CTG TGC AAA ATA ACC TTA ACT<br>Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr<br>370 375 380     |     |     | 1152 |
| 35 | GCA GAC GTT ATG ACA TAC ATA CAT TCT ATG AAT TCC ACT ATT TTG GAG<br>Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu<br>385 390 395 400 |     |     | 1200 |
| 40 | GAC TGG AAT TTT GGT CTA CAA CCT CCC CCA GGA GGC ACA CTA GAA GAT<br>Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp<br>405 410 415     |     |     | 1248 |
| 45 | ACT TAT AGG TTT GTA ACC TCC CAG GCA ATT GCT TGT CAA AAA CAT ACA<br>Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr<br>420 425 430     |     |     | 1296 |
| 50 | CCT CCA GCA CCT AAA GAA GAT CCC CTT AAA AAA TAC ACT TTT TGG GAA<br>Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu<br>435 440 445     |     |     | 1344 |
| 55 | GTA AAT TTA AAG GAA AAG TTT TCT GCA GAC CTA GAT CAG TTT CCT TTA<br>Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu<br>450 455 460     |     |     | 1392 |
| 60 | GGA CGC AAA TTT TTA CTA CAA GCA GGA TTG AAG GCC AAA CCA AAA TTT<br>Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe<br>465 470 475 480 |     |     | 1440 |
| 65 | ACA TTA GGA AAA CGA AAA GCT ACA CCC ACC ACC TCA TCT ACC TCT ACA<br>Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr<br>485 490 495     |     |     | 1488 |
| 70 | ACT GCT AAA CGC AAA AAA CGT AAG CTG TAA<br>Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu<br>500 505                                                             |     |     | 1518 |

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 505 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

# ES 2 280 104 T3

Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val  
 1 5 10 15  
 5 Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn  
 20 25 30  
 Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro  
 35 40 45  
 10 Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys  
 50 55 60  
 Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro  
 65 70 75 80  
 15 Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro  
 100 105 110  
 20 Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp  
 115 120 125  
 Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg  
 130 135 140  
 25 Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly  
 145 150 155 160  
 30 Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr  
 165 170 175  
 Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn  
 180 185 190  
 35 Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met  
 195 200 205  
 Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile  
 210 215 220  
 40 Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu  
 225 230 235 240  
 Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe  
 245 250 255  
 45 Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro  
 260 265 270  
 50 Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser  
 275 280 285  
 Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala  
 290 295 300

5 Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn  
 305 310 315 320  
 10 Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr  
 325 330 335  
 15 Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu  
 340 345 350  
 20 Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu  
 355 360 365  
 25 Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr  
 370 375 380  
 30 Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu  
 385 390 395 400  
 35 Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp  
 405 410 415  
 40 Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr  
 420 425 430  
 45 Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu  
 435 440 445  
 50 Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu  
 450 455 460  
 55 Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe  
 465 470 475 480  
 60 Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr  
 485 490 495  
 65 Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu  
 500 505

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 297 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 50 (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN  
 55 (ix) CARACTERÍSTICA:  
 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
 (B) UBICACIÓN: 1..297  
 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

# ES 2 280 104 T3

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
|    | ATG CAT GGA GAT ACA CCT ACA TTG CAT GAA TAT ATG TTA GAT TTG CAA | 48  |
|    | Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln |     |
|    | 1 5 10 15                                                       |     |
| 5  | CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC TGT TAT GAG CAA TTA AAT GAC AGC TCA | 96  |
|    | Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser |     |
| 10 | 20 25 30                                                        |     |
|    | GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT CCA GCT GGA CAA GCA GAA CCG GAC | 144 |
|    | Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp |     |
|    | 35 40 45                                                        |     |
| 15 | AGA GCC CAT TAC AAT ATT GTA ACC TTT TGT TGC AAG TGT GAC TCT ACG | 192 |
|    | Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr |     |
|    | 50 55 60                                                        |     |
|    | CTT CGG TTG TGC GTA CAA AGC ACA CAC GTA GAC ATT CGT ACT TTG GAA | 240 |
| 20 | Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu |     |
|    | 65 70 75 80                                                     |     |
|    | GAC CTG TTA ATG GGC ACA CTA GGA ATT GTG TGC CCC ATC TGT TCT CAG | 288 |
|    | Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln |     |
|    | 85 90 95                                                        |     |
| 25 | AAA CCA TAA                                                     | 297 |
|    | Lys Pro                                                         |     |

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 98 aminoácidos

35 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

|    |                                                                 |  |
|----|-----------------------------------------------------------------|--|
|    | Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln |  |
|    | 1 5 10 15                                                       |  |
| 45 | Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser |  |
|    | 20 25 30                                                        |  |
|    | Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp |  |
| 50 | 35 40 45                                                        |  |
|    | Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr |  |
| 55 | 50 55 60                                                        |  |
|    | Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu |  |
| 60 | 65 70 75 80                                                     |  |
|    | Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln |  |
|    | 85 90 95                                                        |  |
| 65 | Lys Pro                                                         |  |

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

## ES 2 280 104 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

CCCCGATATC GCCTTTAATG TATAAATCGT CTGG

34

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

CCCCGATATC TCAAATTATT TTCCTACACC TAGTG

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

AAAGATATCT TGTAGTAAAA ATTTGCGTCC TAAAGGAAAC

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

AAAGATATCT AATCTACCTC TACAAC TGCT AAACGCAAAA AACG

44

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases

## ES 2 280 104 T3

|    |                                                  |    |
|----|--------------------------------------------------|----|
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
|    | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
| 5  | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
|    | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:  |    |
| 10 | AAAAGATATC ATGCATGGAG ATACACCTAC ATTGC           | 35 |
|    | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10:           |    |
| 15 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
|    | (A) LONGITUD: 34 pares de bases                  |    |
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
|    | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
| 20 | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
|    | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
|    | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10: |    |
| 25 | TTTTGATATC GGCTCTGTCC GGTTCGTCTT GTCC            | 34 |
|    | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11:           |    |
| 30 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
|    | (A) LONGITUD: 44 pares de bases                  |    |
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
| 35 | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
|    | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
| 40 | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11: |    |
|    | TTTTGATATC CTTGCAACAA AAGGTTACAA TATTGTAATG GGCC | 44 |
| 45 | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12:           |    |
|    | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
|    | (A) LONGITUD: 35 pares de bases                  |    |
| 50 | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
|    | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
| 55 | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
|    | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12: |    |
| 60 | AAAAGATATC TGGTTTCTGA GAACAGATGG GGCAC           | 35 |
|    | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13:           |    |
|    | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
| 65 | (A) LONGITUD: 38 pares de bases                  |    |
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |

## ES 2 280 104 T3

|    |                                                  |    |
|----|--------------------------------------------------|----|
|    | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
| 5  | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
|    | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13: |    |
|    | TTTTGATATC GATTATGAGC AATTAAATGA CAGCTCAG        | 38 |
| 10 | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14:           |    |
|    | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
| 15 | (A) LONGITUD: 35 pares de bases                  |    |
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
|    | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
| 20 | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
|    | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14: |    |
| 25 | TTTTGATATC GTCTACGTGT GTGCTTTGTA CGCAC           | 35 |
|    | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 15:           |    |
|    | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
| 30 | (A) LONGITUD: 39 pares de bases                  |    |
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
|    | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
| 35 | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
|    | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
|    | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15: |    |
| 40 | TTTATCGATA TCGGTCCAGC TGGACAAGCA GAACCGGAC       | 39 |
|    | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 16:           |    |
| 45 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
|    | (A) LONGITUD: 39 pares de bases                  |    |
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
| 50 | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                            |    |
|    | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN                       |    |
| 55 | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16: |    |
|    | TTTTGATATC GATGCCCATTT ACAATATTGT AACCTTTTG      | 39 |
| 60 | (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 17:           |    |
|    | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:             |    |
| 65 | (A) LONGITUD: 294 pares de bases                 |    |
|    | (B) TIPO: ácido nucleico                         |    |
|    | (C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo                    |    |

## ES 2 280 104 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..294

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG CTT ACC AGA AAC GGA TGG GAG | 48  |
| Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Glu |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| TGC AAA TGC AGC GAT TCA AGT GAT CCT CTC ATT ATC GCA GCG AGT ATC | 96  |
| Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro Leu Ile Ile Ala Ala Ser Ile |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| ATT GGG ATC TTG CAC TTG ATA TTG TGG ATT TTT TAT CGT CTT TTC TTC | 144 |
| Ile Gly Ile Leu His Leu Ile Leu Trp Ile Phe Tyr Arg Leu Phe Phe |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| AAA TGC ATT TAT CGT CGC CTT AAA TAC GGT TTG AAA AGA GGG CCT TCT | 192 |
| Lys Cys Ile Tyr Arg Arg Leu Lys Tyr Gly Leu Lys Arg Gly Pro Ser |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| ACG GAA GGA GCG CCT GAG TCT ATG AGG GAA GAA TAT CCG CAG GAA CAG | 240 |
| Thr Glu Gly Ala Pro Glu Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Gln Glu Gln |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| CAG AGT GCT GTG GAT GTT GAC GAT GTT CAT TTT GTC AAC ATA GAG CTG | 288 |
| Gln Ser Ala Val Asp Val Asp Asp Val His Phe Val Asn Ile Glu Leu |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| GAG TAA                                                         | 294 |
| Glu                                                             |     |

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 97 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

## ES 2 280 104 T3

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Glu  
 1 5 10 15  
 5 Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro Leu Ile Ile Ala Ala Ser Ile  
 20 25 30  
 10 Ile Gly Ile Leu His Leu Ile Leu Trp Ile Phe Tyr Arg Leu Phe Phe  
 35 40 45  
 Lys Cys Ile Tyr Arg Arg Leu Lys Tyr Gly Leu Lys Arg Gly Pro Ser  
 50 55 60  
 15 Thr Glu Gly Ala Pro Glu Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Gln Glu Gln  
 65 70 75 80  
 20 Gln Ser Ala Val Asp Val Asp Asp Val His Phe Val Asn Ile Glu Leu  
 85 90 95  
 Glu

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

TTTTGATATC GATATGGAAT GGCTAAAGAC AAGACCAATC

40

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

TTTTGATATC GTTGTGTTGGA TCCCCATTCC CATTG

35

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 21

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

## ES 2 280 104 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

GTTATGACAT ACATACATTC TATG

24

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

20

CCATGCATTC CTGCTTGTAG TAAAAATTTG CGTCC

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

35

CTACAAGCAG GAATGCATGG AGATACACC

29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 24:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

CATCTGAAGC TTAGTAATGG GCTCTGTCCG GTTCTG

36

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

## ES 2 280 104 T3

CATCTGAAGC TTATCAATAT TGTAATGGGC TCTGTCCG

38

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 54 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

CATCTGAAGC TTAAGTGCAA CAAAAGGTTA CAATATTGTA ATGGGCTCTG TCCG

54

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 69 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

CATCTGAAGC TTAAAGCGTA GAGTCACACT TGCAACAAAA GGTTACAATA  
TTGTAATGGG 60  
CTCTGTCCG 69

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

CATCTGAAGC TTATTGTACG CACAACCGAA GCGTAGAGTC ACACTTG

47