



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1301614 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/86 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **C07K 14/25** (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.07.20**

(30) Prioridade(s): **2000.07.21 GB 0017990**
2000.10.20 GB 0025802

(43) Data de publicação do pedido: **2003.04.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.11.29**
002/2007

(73) Titular(es):

GLAXO GROUP LIMITED
GLAXO WELLCOME HOUSE BERKELEY
AVENUE GREENFORD, MIDDLESEX UB6 ONN
GB

(72) Inventor(es):

GLAXO GROUP LIMITED
GB

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA
PT

(54) Epígrafe: **SEQUÊNCIAS DE CODÃO OPTIMIZADO DO VÍRUS DO PAPILOMA**

(57) Resumo:

RESUMO

"SEQUÊNCIAS DE CODÃO OPTIMIZADO DO VÍRUS DO PAPILOMA"

A presente invenção refere-se a métodos e composições úteis no tratamento e prevenção de infecções do vírus do papiloma humano e dos seus sintomas e doenças associados. Mais particularmente, a invenção refere-se a sequências de polinucleótidos que codificam sequências de aminoácidos do vírus do papiloma humano (HPV), em que o perfil de utilização de codões das sequências de polinucleótidos se assemelha àqueles de genes de mamífero altamente expressos.

DESCRIÇÃO

"SEQUÊNCIAS DE CODÃO OPTIMIZADO DO VÍRUS DO PAPILOMA"

A presente invenção refere-se a métodos e composições úteis no tratamento e prevenção de infecções do vírus do papiloma humano e dos seus sintomas e doenças associados.

Foram observadas infecções do vírus do papiloma numa variedade de espécies, incluindo carneiros, cães, coelhos, macacos, gado e humanos. Os vírus do papiloma humano (HPV) foram classificados em mais de 80 tipos (Epidemiology and Biology of Cervical Cancer. Seminars in Surgical Oncology 1999 16:203-211). São definidos novos (originais) tipos como aqueles em que o gene L1 apresenta menos de 90% de identidade de sequência relativamente a sequências L1 de tipos previamente identificados, enquanto que um subtipo apresenta entre 90% e 98% de identidade de sequência L1, e uma variante mais de 98% de identidade de sequência (relativamente ao tipo prototípico (parental)). Os vírus do papiloma infectam geralmente os epitélios, mas os tipos diferentes de HPV causam doenças distintas. Por exemplo, os tipos 1-4, 7, 10 e 26-29 causam verrugas cutâneas benignas, os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68 estão associados com cancros cervicais e os tipos 6 e 11 estão implicados em verrugas genitais (condilomatose não maligna do tracto genital).

A maioria das verrugas genitais (> 90%) contém os genótipos 6 e 11 de HPV. Enquanto que o HPV-6 é o genótipo mais prevalente, identificado em infecções simples, o HPV-6 e HPV-11 podem ocasionalmente ocorrer na mesma lesão. As verrugas ocorrem

geralmente em diversos locais em indivíduos infectados e mais de 60% de doentes com parceiros que têm condiloma (verrugas genitais) desenvolvem lesões, com um tempo médio de incubação de 3 meses. Está actualmente disponível uma gama de opções de tratamento. Contudo, baseiam-se na excisão ou ablação e/ou na utilização de géis e cremes tópicos. Não estão ausentes de dor, podem requerer visitas clínicas frequentes, e a eficácia é altamente variável. A recorrência da doença permanece um problema significativo para a gestão eficaz desta doença.

As verrugas genitais podem regredir espontaneamente e o principal evento responsável pela regressão da verruga parece ser a imunidade mediada por célula. As elevadas taxas de regressão espontâneas indicam que a imunidade celular do hospedeiro pode resolver a doença clínica e tornar a intervenção por imunoterapia uma opção para o tratamento ou prevenção de verrugas genitais. Os objectivos para gestão da doença são de uma terapia específica de vírus que seja ausente de dor, requeira um mínimo de visitas clínicas, possua elevadas taxas de resolução da doença e que reduza/minimize a recorrência da doença.

O HPV provou ser de difícil cultivo em cultura de tecidos, não existindo, deste modo, nenhuma vacina viral viva ou atenuada tradicional. O desenvolvimento de uma vacina de HPV foi também retardado pela falta de um modelo animal adequado em que possa ser estudado o vírus humano. Isto é porque os vírus são altamente específicos da espécie, não sendo assim possível infectar um animal imunocompetente com um vírus do papiloma humano, como seria requerido para testes de segurança antes da vacina ser primeiro tentada em humanos.

Os vírus do papiloma têm um genoma de ADN que codifica genes “precoces” e “tardios” designados E1 até E7, L1 e L2. Foi

demonstrado que as sequências dos genes precoces têm funções relacionadas com a replicação e transcrição do ADN viral, evasão da imunidade do hospedeiro, e alteração do ciclo celular normal do hospedeiro e outros processos. Por exemplo, a proteína E1 é uma ADN helicase dependente de ATP e está envolvida na iniciação do processo de replicação do ADN viral enquanto que E2 é uma proteína reguladora que controla tanto a expressão génica viral como a replicação de ADN. Através da sua capacidade de ligação tanto a E1 como à origem de replicação viral, E2 conduz a uma concentração local de E1 na origem, estimulando assim a iniciação da replicação do ADN viral. A proteína E4 parece ter uma variedade de funções mal definidas mas entre estas pode ser a ligação ao citoesqueleto da célula hospedeira, enquanto que E5 parece atrasar a acidificação dos endossomas resultando em expressão aumentada do receptor de EGF à superfície celular e tanto E6 como E7 são conhecidas por se ligarem às proteínas celulares p53 e pRB, respectivamente. As proteínas E6 e E7 de tipos de HPV associados com cancro cervical são oncogenes conhecidos. L1 e L2 codificam as duas proteínas estruturais virais (cápside).

Historicamente, as vacinas têm sido vistas como um modo de prevenir a infecção por um patogéneo, iniciando o sistema imunológico a reconhecer o patogéneo e a neutralizá-lo se ocorrer uma infecção. A vacina inclui um ou mais抗énios do patogéneo, geralmente o organismo inteiro, quer morto ou numa forma enfraquecida (atenuada), ou péptidos抗énicos seleccionados do organismo. Quando o sistema imunológico é exposto ao(s)抗énio(s), são produzidas células que retêm uma "memória" imunológica do(s) mesmos(s) durante toda a vida do indivíduo. A exposição subsequente ao mesmo抗énio (e. g., após infecção pelo patogéneo) estimula uma resposta imunológica específica que resulta na eliminação ou inactivação do agente infeccioso.

Existem dois tipos de resposta imunológica: uma resposta humoral (anticorpo) e uma resposta mediada por células. Os抗igenios proteicos derivados de patogéneos que se replicam intracelularmente (vírus e algumas bactéria) são processados dentro da célula hospedeira infectada libertando curtos péptidos que são subsequentemente apresentados na superfície da célula infectada em associação com moléculas de histocompatibilidade major de classe I (MHC I). Quando este complexo associado de MHC I e péptido é contactado por células T CD8+ específicas de抗igenio, as células T são activadas, adquirindo actividade citotóxica. Estas células T citotóxicas (CTLs) podem lisar células hospedeiras infectadas, limitando assim a replicação e propagação do patogéneo infectante. Outro tipo importante de resposta imunológica é controlado por células T CD4+. Quando é libertado no meio extracelular抗igenio derivado de patogéneos, estes podem ser absorvidos por células apresentadoras de抗igenio (APCs) especializadas e apresentados à superfície destas células em associação com moléculas de MHC II. O reconhecimento do抗igenio neste complexo estimula células T CD4+ a segregarem factores solúveis (citocinas) que regulam os mecanismos efectores de outras células T. O anticorpo é produzido por células B. A ligação do抗igenio ao anticorpo segregado pode neutralizar a infectividade de um patogéneo e a ligação do抗igenio ao anticorpo ligado a membrana na superfície de células B, estimula a divisão das células B amplificando assim a resposta das células B. Em geral, as respostas imunológicas tanto de anticorpo como mediadas por células (CD8+ e CD4+) são requeridas para controlar infecções por patogéneos.

Acredita-se que possa ser possível aproveitar o sistema imunológico, mesmo após infecção por um patogéneo, para controlar ou resolver a infecção por inactivação ou eliminação

do patogéneo. Essas terapias imunológicas (também conhecidas como vacinas "terapêuticas" ou imunoterapêuticas) requereriam idealmente uma resposta mediada por células que fosse eficaz, embora pudesse ser evocadas respostas imunológicas tanto humorais como mediadas por células.

Foi demonstrado (Benvenisty, N e Reshaf, L. PNAS 83 9551-9555) que a inoculação de murganhos com ADN precipitado com fosfato de cálcio resulta na expressão de péptidos codificados pelo ADN. Subsequentemente, foi mostrado que a injecção intramuscular em murganhos de ADN plasmídico que não tinha sido precipitado resulta na incorporação do ADN nas células do músculo e expressão da proteína codificada. Porque a expressão do ADN resulta na produção de proteínas codificadas pelo patogéneo dentro das células do hospedeiro, como numa infecção natural, este mecanismo pode estimular a resposta imunológica mediada por células requerida para terapias imunológicas ou vacinação terapêutica, uma vez que poderia ser aplicado um fármaco baseado em ADN como uma vacina profilática ou como uma terapia imunológica. As vacinas de ADN são descritas no documento WO90/11092 (Vical, Inc.).

A vacinação de ADN pode ser administrada através de mecanismos diferentes da injecção intramuscular. Por exemplo, a administração na pele retira vantagem do facto dos mecanismos imunológicos serem altamente activos em tecidos que são barreiras à infecção, tais como a pele e membranas mucosas. A administração na pele poderia ser através de injecção, através injector a jacto (que força um líquido através da pele, ou tecidos subjacentes incluindo músculos, sob pressão) ou através de bombardeamento de partículas, no qual o ADN pode ser revestido sobre partículas de densidade suficiente para penetrarem no epitélio (Patente U.S. Nº 5371015). Por exemplo, as sequências de nucleótidos podem ser incorporadas num

plasmídeo que é revestido sobre esferas de ouro que são depois administradas sob alta pressão na epiderme, tal como, por exemplo, como descrito em Haynes *et al.* J. Biotechnology 44: 37-42 (1996). A projecção destas partículas na pele resulta na transfecção directa tanto de células epidérmicas como células epidérmicas de Langerhan. As células de Langerhan são células apresentadoras de抗原 (APC) que incorporam o ADN, expressam os péptidos codificados, e processam estes para apresentação em proteínas do MHC da superfície celular. As células de Langerhan transfectadas migram para os nódulos linfáticos onde apresentam os fragmentos de抗原 apresentados, aos linfócitos, evocando uma resposta imunológica. São requeridas quantidades muito pequenas de ADN (menos do que 1 µg, frequentemente menos do que 0,5 µg) para induzir uma resposta imunológica através de administração mediada por partículas na pele e isto contrasta com as quantidades de miligramas de ADN que se sabe serem requeridas para produzir respostas imunológicas subsequentes à injecção intramuscular directa.

A expressão e detecção de proteínas de HPV em células de mamífero transfectadas, tais como células HeLa, 293 ou CHO, provou ser frequentemente difícil e, deste modo, para estudos bioquímicos e imunológicos que requerem expressão detectável de proteínas, ou quantidades de proteínas puras, são frequentemente utilizados sistemas de expressão de proteína de *E. coli*, Baculovírus ou Levedura. Nestes sistemas, os rendimentos de proteína são adequados tornando praticáveis a análise funcional, e purificação e os estudos bioquímicos e imunológicos subsequentes. Contudo, os métodos directos de detecção de proteína (e. g., transferência de Western) não detectam tipicamente a expressão da proteína E1 em células de mamífero transfectadas, mesmo quando são utilizados vectores com promotores fortes, tais como CMV ou SV40. Os métodos concebidos

para aumentar a expressão da proteína E1 em células de mamífero incluem a clonagem das sequências flanqueadoras 5' conjuntamente com o gene E1 (Remm *et al.* J.Virol 1999 **73**, 3062-3070) e amplificação do vector plasmídico E1 transfetado após transfecção (Zou *et al.* J.Virol 1998 **72**, 3436-3441). A amplificação do vector plasmídico de entrada por replicação após transfecção tem o efeito global de aumentar o número de cópias do gene E1 na célula, impulsionando assim os níveis de proteína e facilitando, assim, a detecção de proteína (por transferência de Western). Porque a expressão e detecção da proteína E1 é problemática em células de mamífero, diversos autores recorreram à detecção da expressão da proteína por transcrição-tradução *in vitro* com metionina marcada com ^{35}S , utilizando o sistema de reticulócito de coelho (Promega), (Gopalakrishnan *et al.* Virology 1999 **256**, 330-339., Safari *et al.* Virology 1995 **211**, 385-396). Contudo, isto é um sistema isento de células e requer a utilização de um promotor modificado que contém a sequência de ligação para a ARN polimerase do fago T7.

A expressão da proteína E1 foi adicionalmente detectada indirectamente, através da detecção da replicação de ADN *in vitro* de um plasmídeo contendo uma origem do HPV de replicação de ADN. A detecção deste plasmídeo contendo origem replicada actua como um sucedâneo para a expressão da proteína E1 (e E2) (Gopalakrishnan *et al.*, Virology 1999 **256**, 330-339., Lu *et al* J.Virol 1993 **67**, 7131-7139 e Del Vecchio *et al* J.Virol 1992 **66**, 5949-5958). Tanto E1 como E2 são requeridos para replicação da origem do HPV, deste modo a transfecção de células de mamífero com plasmídeos codificando ambos os genes E1 e E2, mais um terceiro plasmídeo que contém uma origem do HPV de replicação de ADN, irá apenas resultar em replicação do plasmídeo que contém a origem se a expressão da proteína E1 (e proteína E2) for bem

sucedida, embora indetectável pelo método de detecção de proteína convencional (transferência de Western).

O código de ADN tem 4 letras (A, T, C e G) e utiliza estas para formar "codões" de três letras que representam os aminoácidos das proteínas codificadas nos genes de um organismo. A sequência linear de codões ao longo da molécula de ADN é traduzida na sequência linear de aminoácidos na(s) proteína(s) codificada(s) por aqueles genes. O código é altamente degenerado, com 61 codões a codificar para 20 aminoácidos naturais e 3 codões que representam sinais de "terminação". Assim, a maioria dos aminoácidos são codificados por mais do que um codão - de facto, vários são codificados por quatro ou mais codões diferentes.

Nos casos em que está disponível mais de um codão para codificar para um determinado aminoácido, foi observado que os perfis de utilização de codões dos organismos são altamente não aleatórios. Espécies diferentes mostram um pendor diferente na sua selecção de codão e, além disso, a utilização de codões pode ser acentuadamente diferente numa única espécie entre genes que são expressos a níveis elevados e baixos. Este pendor é diferente em vírus, plantas, bactérias e células de mamífero, e algumas espécies mostram um forte pendor que se afasta de uma selecção aleatória de codões de outras. Por exemplo, os humanos e outros mamíferos apresentam um pendor menos fortemente acentuado do que determinadas bactérias ou vírus. Por estas razões, existe uma probabilidade significativa de que um gene de mamífero expresso em *E. coli* ou um gene viral expresso em células de mamífero terá uma distribuição inadequada de codões para expressão eficiente. Contudo, um gene com um perfil de utilização de codões adequado para expressão de *E. coli* pode também ser eficientemente expresso em humanos. Acredita-se que a presença numa sequência de ADN heteróloga de aglomerados de

codões que são raramente observados no hospedeiro, em que deve ocorrer a expressão, é predictiva de baixos níveis de expressão heteróloga nesse hospedeiro.

Existem diversos exemplos em que a alteração de codões a partir daqueles que são raros no hospedeiro para aqueles que são preferidos pelo hospedeiro ("optimização de codão") aumentou os níveis de expressão heteróloga, por exemplo, os genes tardios de L1 e L2 de BPV (vírus do papiloma de bovinos) foram submetidos a optimização de codão para perfis de utilização de codões de mamífero e isto foi demonstrado produzir níveis de expressão aumentada relativamente às sequências de HPV de tipo selvagem em cultura de células de mamífero (Cos-1) (Zhou et al. J. Virol 1999. **73**, 4972-4982). Neste trabalho, cada codão de BPV que ocorresse em BPV com uma frequência duas vezes superior do que em mamíferos (razão de utilização > 2), e a maioria dos codões com uma razão de utilização > 1,5 foram conservadoramente substituídos pelo codão de mamífero preferencialmente utilizado. Nos documentos WO97/31115, WO97/48370 e WO98/34640 (Merck & Co., Inc.) a optimização de codão dos genes do VIH, ou seus segmentos, foi demonstrado resultar em expressão proteica aumentada e imunogenicidade melhorada quando são utilizadas sequências submetidas a optimização de codão como vacinas de ADN no mamífero hospedeiro para o qual foi concebida a optimização. Neste trabalho, as sequências consistem inteiramente em codões optimizados (excepto nos casos em que isto introduziria um sítio de restrição indesejado, sítio de *splicing* de intrão, etc.) porque cada codão viral é conservadoramente substituído com o codão óptimo para o hospedeiro pretendido.

No documento WO 011446 (Merck e Co., Inc) este mesmo método foi aplicado aos genes de HPV.

De acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona uma sequência de polinucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos de HPV de um抗原 precoce de HPV, ou seu fragmento, sendo o referido polinucleótido capaz de produzir uma resposta imunológica quando administrado *in vivo*, em que o referido polinucleótido tem um coeficiente de utilização de codões (como definido abaixo) superior a 0,5 mas menor que 1,0 para um gene humano altamente expresso. De um modo preferido, a sequência de polinucleótidos é uma sequência de ADN. Idealmente, o perfil de utilização de codões da sequência de polinucleótidos também se assemelha àquele de genes de *E. coli* altamente expressos. A sequência de polinucleótidos pode ser uma sequência de ADN, por exemplo, uma sequência de ADN de cadeia dupla. De um modo preferido, a sequência de polinucleótidos codifica um polipeptídeo de HPV de um tipo ou subtipo de HPV associado com o cancro cervical, verrugas cutâneas ou verrugas genitais benignas, por exemplo, tipos 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, de um modo preferido tipos 6, 11, 16, 18, 33 ou 45, que estão associados particularmente com o cancro cervical e verrugas genitais, de um modo muito preferido, HPV 11, 6a ou 6b.

De acordo com o exposto, é proporcionado um gene sintético compreendendo uma pluralidade de codões que codificam conjuntamente uma sequência de aminoácidos de HPV, em que a selecção dos codões possíveis, utilizados para codificar a sequência de aminoácidos foi alterada para se assemelhar à utilização óptima de codão humano, de modo que a frequência de utilização de codões no gene sintético se assemelhe mais intimamente àquela de genes humanos altamente expressos do que àquela de genes do vírus do papiloma. De um modo preferido, o perfil de utilização de codões é substancialmente o mesmo que aquele para genes humanos altamente expressos.

Em determinadas formas de realização, a sequência de aminoácidos codificada é uma sequência de aminoácidos de HPV de tipo selvagem. Em formas de realização alternativas, a sequência de aminoácidos codificada é uma sequência de aminoácidos de HPV mutada, compreendendo a sequência de tipo selvagem com alterações de aminoácidos, por exemplo, mutações pontuais de aminoácidos, suficientes para reduzir ou inactivar uma ou mais das funções biológicas naturais do polipéptido. A sequência de aminoácidos mutada reterá desejavelmente a imunogenicidade do polipéptido de tipo selvagem.

O polipéptido de HPV codificado pode compreender um produto génico precoce, tal como E1, E2 ou E7, ou um seu fragmento, análogo ou fusão. Um polinucleótido da invenção pode, por exemplo, codificar uma fusão entre dois ou mais produtos génicos precoces de HPV, um produto génico precoce de HPV e um produto génico tardio de HPV, por exemplo, L1 ou L2, ou um seu fragmento, análogo ou fusão, ou entre dois ou mais produtos génicos tardios de HPV, entre um ou mais fragmentos de produtos génicos de HPV, ou entre um produto génico de HPV (ou um seu fragmento) e um polipéptido derivado de uma fonte diferente de HPV, por exemplo, um péptido ou polipéptido adjuvante ou alvo, tal como um péptido nuclear de HBV. As fusões podem ser entre produtos génicos de HPV derivados do mesmo, ou diferentes, tipos ou subtipos virais. Essas fusões reterão desejavelmente a imunogenicidade dos componentes polipeptídicos fundidos. De um modo preferido, o polipéptido de HPV codificado compreende a totalidade ou uma parte de um produto génico precoce, de um modo muito preferido E1 ou E2. Numa forma de realização particular, a sequência de polinucleótidos codifica o polipéptido E1 de tipo selvagem de HPV 6b como apresentado na Fig. 1, ou um seu fragmento ou análogo. Em formas de realização alternativas, a sequência de polinucleótidos pode codificar um ou mais de: a sequência de aminoácidos mutada de HPV6b E1 apresentada na

fig. 2; a sequência de aminoácidos de E2 de tipo selvagem (Fig. 3) de HPV 11 ou de 6a ou 6b; a sequência de aminoácidos mutada de E2 HPV6b da Fig. 4b; e a sequência mutada de HPV11 E2 da Fig. 4a, ou seus fragmentos, análogos ou fusões, em que os polipéptidos codificados retêm a imunogenicidade.

De acordo com a presente invenção, o perfil de utilização de codões do polinucleótido excluirá, de um modo preferido, codões com um valor RSCU menor que 0,2 em genes altamente expressos do organismo alvo. Um valor de utilização relativa de codões sinónimos (RSCU) é o número observado de codões dividido pelo número esperado se todos os codões para esse aminoácido forem igualmente utilizados em termos de frequência. Um polinucleótido da presente invenção terá geralmente um coeficiente de utilização de codões (como definido abaixo) para genes humanos altamente expressos superior a 0,5 mas menor que 1. Desejavelmente, o polinucleótido terá também um coeficiente de utilização de codões para genes de *E. coli* altamente expressos superior a 0,5, de um modo preferido superior a 0,6, de um modo muito preferido superior a 0,7.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona uma sequência de polinucleótidos como apresentada na fig. 5 ou fig. 6, ou um seu fragmento ou análogo que mantém o seu perfil de utilização de codões. Numa forma de realização adicional, a presente invenção proporciona uma sequência de polinucleótidos complementar à sequência apresentada na fig. 5 ou fig. 6.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, é proporcionado um vector de expressão que comprehende, e é capaz de dirigir, a expressão de uma sequência de polinucleótidos de acordo com o primeiro aspecto da invenção, codificando uma sequência de aminoácidos de HPV, em que o perfil de utilização de codões da sequência de polinucleótidos se assemelha àquele de

genes humanos altamente expressos. O vector pode ser adequado para dirigir a expressão de ADN heterólogo em células bacterianas, de insecto ou mamífero, particularmente células humanas. Numa forma de realização, o vector de expressão é p7313PLc (Fig.7).

De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é proporcionada uma célula hospedeira compreendendo uma sequência de polinucleótidos, de acordo com o primeiro aspecto da invenção, ou um vector de expressão de acordo com o segundo aspecto. A célula hospedeira pode ser bacteriana, e. g., *E. coli*, mamífero, e. g., humana, ou pode ser uma célula de insecto. As células de mamífero compreendendo um vector, de acordo com a presente invenção, podem ser células cultivadas transfectadas *in vitro* ou podem ser transfectadas *in vivo* por administração do vector ao mamífero.

Num quarto aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma sequência de polinucleótidos de acordo com o primeiro aspecto da invenção. De um modo preferido, a composição compreende um vector de ADN de acordo com o segundo aspecto da presente invenção. Em formas de realização preferidas, a composição compreende uma pluralidade de partículas, de um modo preferido partículas de ouro, revestidas com ADN compreendendo um vector codificando uma sequência de polinucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos de HPV, em que o perfil de utilização de codões da sequência de polinucleótidos se assemelha àquele de genes de mamífero altamente expressos, particularmente genes humanos. Em formas de realização alternativas, a composição compreende um excipiente farmaceuticamente aceitável e um vector de ADN de acordo com o segundo aspecto da presente invenção. A composição pode também incluir um adjuvante.

Num aspecto adicional, a presente invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica incluindo o passo de alteração do perfil de utilização de codões de uma sequência de nucleótidos de HPV de tipo selvagem, ou criação de uma sequência de polinucleótidos sinteticamente, para produzir uma sequência que tem um perfil de utilização de codões que se assemelha àquele de genes de mamífero altamente expressos e codificando uma sequência de aminoácidos de HPV de tipo selvagem ou uma sequência de aminoácidos mutada de HPV compreendendo a sequência de tipo selvagem com alterações de aminoácidos suficientes para inactivar uma ou mais das funções naturais do polipéptido.

É também proporcionada a utilização de um polinucleótido de acordo com o primeiro aspecto, ou de um vector de acordo com um segundo aspecto da invenção, no tratamento ou profilaxia de uma infecção de HPV, de um modo preferido uma infecção por um tipo ou subtípo de HPV associado com cancro cervical, verrugas cutâneas ou verrugas genitais benignas, por exemplo, tipos 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Em determinadas formas de realização, a invenção proporciona a utilização de um polinucleótido de acordo com o primeiro aspecto, ou de um vector de acordo com um segundo aspecto da invenção, no tratamento ou profilaxia de uma infecção de HPV do tipo 6, 11, 16, 18, 33 ou 45, que está associado particularmente com o cancro cervical e verrugas genitais, de um modo muito preferido HPV 11, 6a ou 6b. A invenção também proporciona a utilização de um polinucleótido de acordo com o primeiro aspecto, um vector de acordo com o segundo aspecto da invenção ou uma composição farmacêutica de acordo com o quarto aspecto da invenção, no tratamento ou profilaxia de verrugas cutâneas (pele), verrugas genitais, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), displasia cervical, neoplasia intraepitelial cervical (CIN) ou cancro cervical. De

acordo com o exposto, a presente invenção também proporciona a utilização de um polinucleótido de acordo com o primeiro aspecto, ou de um vector de acordo com o segundo aspecto da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de uma infecção de HPV de qualquer um ou mais dos tipos 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, ou quaisquer dos seus sintomas ou doenças associados.

A presente invenção também proporciona métodos de tratamento ou prevenção infecções de HPV, particularmente infecções por qualquer um ou mais dos tipos de HPV 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68, ou quaisquer dos seus sintomas ou doenças associados, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um polinucleótido de acordo com o primeiro aspecto, um vector de acordo com o segundo aspecto ou uma composição farmacêutica de acordo com o quarto aspecto da invenção. A administração de uma composição farmacêutica pode tomar a forma de uma ou mais doses individuais, por exemplo, num regime de vacinação terapêutica "principal-reforço". Em determinados casos a vacinação "principal" pode ser através de transferência de ADN mediada por partícula de um polinucleótido de acordo com a presente invenção, incorporada, de um modo preferido, num vector derivado de plasmídeo e o "reforço" através de administração de um vector viral recombinante compreendendo a mesma sequência de polinucleótidos.

Ao longo da presente descrição e das reivindicações anexas, as palavras "compreendem" e "incluem" e as variações como "compreende", "compreendendo", "inclui" e "inclusindo" são para ser interpretadas inclusivamente. Isto é, estas palavras pretendem transmitir a inclusão possível de outros elementos ou

entidades não especificamente citadas, onde o contexto o permita.

O termo "análogo" refere-se a um polinucleótido que codifica a mesma sequência de aminoácidos como outro polinucleótido da presente invenção mas que, através da redundância do código genético, tem uma sequência de nucleótidos diferente embora mantendo o mesmo perfil de utilização de codões, por exemplo, tendo o mesmo coeficiente de utilização de codões ou um coeficiente de utilização de codões dentro de 0,1, de um modo preferido dentro de 0,05 daquele do outro polinucleótido.

O termo "perfil de utilização de codões" refere-se às frequências médias para todos os codões na sequência de nucleótidos, gene ou classe de genes sob discussão (e. g., genes de mamífero altamente expressos). Os perfis de utilização de codões para mamíferos, incluindo humanos, podem ser encontrados na literatura (ver, e. g., Nakamura et al., Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215).

Nos polinucleótidos da presente invenção, o perfil de utilização de codões é alterado a partir daquele típico de vírus do papiloma humano de modo a representar mais proximamente o pendor de codão do organismo alvo, e. g., *E. coli* ou um mamífero, especialmente um humano. O "coeficiente de utilização de codões" é uma medida de quão próximo o perfil de utilização de codões de uma determinada sequência de polinucleótidos se assemelha àquele de uma espécie alvo. As frequências dos codões podem ser derivadas a partir de fontes da literatura para os genes altamente expressos de muitas espécies (ver, e. g., Nakamura et al. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215). As frequências dos codões para cada um dos 61 codões (expressas como o número de ocorrências que ocorrem por 1000 codões da classe seleccionada de genes) são normalizadas para cada um dos

vinte aminoácidos naturais, de modo que o valor para o codão mais frequentemente utilizado para cada aminoácido é definido como 1 e as frequências para os codões menos comuns são escalonados para se encontrarem entre zero e 1. Assim, a cada um dos 61 codões é atribuído um valor de 1 ou inferior, para os genes altamente expressos da espécie alvo. De modo a calcular um coeficiente de utilização de codões para um polinucleótido específico, relativamente aos genes altamente expressos dessa espécie, o valor escalonado para cada codão do polinucleótido específico é anotado e é tomada a média geométrica de todos estes valores (pela divisão da soma do logaritmos naturais destes valores pelo o número total de codões e cálculo do antilogaritmo). O coeficiente terá um valor entre zero e 1 e quanto mais elevado for o coeficiente mais codões no polinucleótido são codões frequentemente utilizados. Se uma sequência de polinucleótidos tiver um coeficiente de utilização de codões de 1, todos os codões são os codões "mais frequentes" para os genes altamente expressos da espécie alvo.

Estão dentro do âmbito da invenção sequências de polinucleótidos mais curtas. Por exemplo, um polinucleótido da invenção pode codificar um fragmento de uma proteína de HPV. Um polinucleótido que codifica um fragmento de, pelo menos, 8, por exemplo, 8-10 aminoácidos ou até 20, 50, 60, 70, 80, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento são considerados enquadrados dentro do âmbito da invenção, desde que o polinucleótido tenha um perfil de utilização de codões que se assemelhe àquele de um gene de mamífero altamente expresso, e o oligo codificado ou polipéptido demonstrem antigenicidade de HPV. Em particular, mas não exclusivamente, este aspecto da invenção abrange a situação quando o polinucleótido codifica um fragmento de uma sequência completa de proteína de HPV e pode representar um ou mais epitópos discretos dessa proteína.

Os polinucleótidos da presente invenção mostram uma expressão mais elevada em *E. coli* e células de mamífero do que as sequências de tipo selvagem correspondentes que codificam as mesmas sequências de aminoácidos. Embora não desejando estar ligado a qualquer teoria, acredita-se isto se deve a, pelo menos, duas razões. Primeiro, tendo um perfil de utilização de codões mais próximo daquele da célula hospedeira, as sequências são mais facilmente processadas pela maquinaria de tradução celular. Segundo, uma vez que até 30% da sequência de nucleótidos (ou mais) é diferente da sequência de tipo selvagem, sítios que interferem com a transcrição ou tradução (tais como sítios de ligação a proteína) terão sido removidos ou alterados.

Nalgumas formas de realização, os polinucleótidos de acordo com a presente invenção mostram perfis de utilização de codões que se assemelham àqueles de genes de *E. coli* e mamífero (e. g., humano). Isto é particularmente vantajoso onde uma sequência é para ser utilizada em vacinação de um mamífero e na produção de quantidades significativas da proteína antigénica *in vitro* utilizando células de *E. coli* (e. g., para utilização em ensaios, tais como imunoensaios para avaliar os níveis de expressão em tecidos de mamífero ou humanos).

Como acima discutido, a presente invenção inclui vectores de expressão que compreendem as sequências de nucleótidos da invenção. Esses vectores de expressão são construídos rotineiramente na técnica da biologia molecular e podem, por exemplo, envolver a utilização de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, intensificadores apropriados e outros elementos, tais como, por exemplo, sinais de poliadenilação que podem ser necessários, e que são posicionados na orientação correcta, de modo a permitirem a expressão da proteína. Outros vectores adequados seriam evidentes aos especialistas na técnica. Ainda a título exemplificativo, a este respeito, faz-se referência a

Sambrook *et al.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2^a Edição. CSH Laboratory Press. (1989).

De um modo preferido, um polinucleótido da invenção, ou para utilização num vector da invenção, está ligado operativamente a uma sequência de controlo que é capaz de proporcionar a expressão da sequência codificadora pela célula hospedeira, *i. e.,* o vector é um vector de expressão. O termo "ligado operativamente" refere-se a uma justaposição em que os componentes descritos estão num relação que lhes permite funcionar no seu modo pretendido. Uma sequência reguladora, tal como um promotor, "ligada operativamente" a uma sequência codificadora é posicionada de tal forma que a expressão da sequência codificadora é realizada sob condições compatíveis com a sequência reguladora.

Os vectores podem ser, por exemplo, plasmídeos, cromossomas artificiais (*e. g.*, BAC, PAC, YAC), vírus ou vectores fágicos proporcionados com uma origem de replicação, opcionalmente um promotor para a expressão do polinucleótido e, opcionalmente, um regulador do promotor. Os vectores podem conter um ou mais genes marcadores de selecção, por exemplo, um gene de resistência à ampicilina ou canamicina no caso de um plasmídeo bacteriano ou um gene de resistência para um vector fúngico. Os vectores podem ser utilizados *in vitro*, por exemplo, para a produção de ADN ou ARN ou utilizados para transfecção ou transformar uma célula hospedeira, por exemplo, uma célula hospedeira de mamífero, *e. g.*, para a produção da proteína codificada pelo vector. Os vectores podem também ser adaptados para serem utilizados *in vivo*, por exemplo, num método de vacinação de ADN ou de terapia génica.

Os promotores e outros sinais de regulação da expressão podem ser seleccionados para serem compatíveis com a célula hospedeira para a qual a expressão é concebida. Por exemplo, os promotores de mamífero incluem o promotor da metalotioneína, que pode ser induzido em resposta a metais pesados, tais como cádmio, e o promotor da β -actina. Também podem ser utilizados promotores virais, tais como o promotor do抗igénio T grande de SV40, promotor imediatamente precoce (IE) de citomegalovírus (CMV) humano, promotor LTR do vírus do sarcoma de Rous, promotor de adenovírus, ou um promotor de HPV, particularmente a região reguladora a montante de HPV (URR). Todos estes promotores estão bem descritos e prontamente disponíveis na técnica.

Exemplos de vectores virais adequados incluem os vectores virais de herpes simplex, vectores de vacínia ou alfa-vírus e retrovírus, incluindo lentivírus, adenovírus e vírus adeno-associados. As técnicas de transferência génica utilizando estes vírus são conhecidas dos especialistas na técnica. Os vectores de retrovírus, por exemplo, podem ser utilizados para integrar estavelmente o polinucleótido da invenção no genoma do hospedeiro, embora essa recombinação não seja preferida. Em contraste, os vectores de adenovírus defeituosos na replicação permanecem episomais e permitem, deste modo, a expressão transitória. Os vectores capazes de conduzir a expressão em células de insecto (por exemplo, vectores de baculovírus), em células humanas ou em bactérias podem ser utilizados de modo a produzir quantidades da proteína de HPV codificada pelos polinucleótidos da presente invenção, por exemplo, para utilização como vacinas de subunidade ou em imunoensaios.

Os polinucleótidos de acordo com a invenção têm utilidade na produção por expressão de proteínas codificadas, cuja expressão pode ocorrer *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Os nucleótidos podem, deste modo, estar envolvidos na síntese de proteína

recombinante, por exemplo, para aumentar rendimentos, ou de facto podem encontrar utilização como agentes terapêuticos por si só, utilizados em técnicas de vacinação de ADN. Nos casos em que os polinucleótidos da presente invenção são utilizados na produção das proteínas codificadas *in vitro* ou *ex vivo*, as células, por exemplo, em cultura celular, serão modificadas para incluir o polinucleótido a ser expresso. Essas células incluem linhas celulares transitórias de mamífero, ou de um modo preferido estáveis. Os exemplos particulares de células que podem ser modificadas por inserção de vectores que codificam para um polipéptido, de acordo com a invenção, incluem células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, 293 e COS. De um modo preferido, a linha celular seleccionada será uma em que não é apenas estável, mas também permite glicosilação madura e expressão à superfície celular de um polipéptido. A expressão pode ser realizada em oócitos transformados. Um polipéptido pode ser expresso a partir de um polinucleótido da presente invenção, em células de um animal não humano transgénico, de um modo preferido um murganho. Um animal não humano transgénico que expressa um polipéptido a partir de um polinucleótido da invenção está incluído dentro do âmbito da invenção.

Nos casos em que os polinucleótidos da presente invenção encontram utilização como agentes terapêuticos, e. g., em vacinação de ADN, o ácido nucleico será administrado ao mamífero, e. g., humano, a ser vacinado. O ácido nucleico, tal como ARN ou ADN, de um modo preferido ADN, é proporcionado na forma de um vector, tal como aqueles acima descritos, que pode ser expresso nas células do mamífero. Os polinucleótidos podem ser administrados através de qualquer técnica disponível. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser introduzido através de injecção de agulha, de um modo preferido, intradermicamente, subcutaneamente ou intramuscularmente. Alternativamente, o ácido nucleico pode ser transferido directamente na pele utilizando um

dispositivo de transferência de ácidos nucleicos, tal como transferência de ADN mediada por partículas (PMDD). Neste método, são revestidas partículas inertes (tais como esferas de ouro) com um ácido nucleico, e são aceleradas a velocidades suficientes para lhe permitir penetrar uma superfície de um receptor (e. g., pele), por exemplo, através de descarga sob alta pressão a partir de um dispositivo projectante. (As partículas revestidas com uma molécula de ácido nucleico da presente invenção estão dentro do âmbito da presente invenção, assim como os dispositivos da transferência carregados com essas partículas). A composição compreende, desejavelmente, partículas de ouro que têm um diâmetro médio de 0,5-5 µm, de um modo preferido cerca de 2 µm. Em formas de realização preferidas, as esferas revestidas de ouro são carregadas em tubagem para servirem como cartuchos de modo que cada cartucho contenha 0,1-1 mg, de um modo preferido 0,5 mg de ouro revestido com 0,1-5 µg, de um modo preferido cerca de 0,5 µg de ADN/cartucho.

As técnicas adequadas para introduzir o polinucleótido simples ou o vector num doente, incluem aplicação tópica com um veículo apropriado. O ácido nucleico pode ser administrado topicamente à pele, ou às superfícies mucósicas, por exemplo, através de administração intranasal, oral, intravaginal ou intrarrectal. O polinucleótido simples ou vector pode estar presente conjuntamente com um excipiente farmaceuticamente aceitável, tal como soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS). A incorporação de ADN pode ser mais facilitada através da utilização de agentes facilitantes, tais como bupivacaína, quer separadamente ou incluída na formulação de ADN. Outros métodos de administração do ácido nucleico directamente a um receptor incluem ultra-som, estimulação eléctrica, electroporação e microtransferência que é descrita no documento US-5697901.

A incorporação das construções de ácido nucleico pode ser aumentada através de diversas técnicas conhecidas de transfecção, por exemplo, aquelas incluindo a utilização de agentes de transfecção. Os exemplos destes agentes incluem agentes catiónicos, por exemplo, fosfato de cálcio e DEAE-Dextrano e lipofectantes, por exemplo, lipofectam e transfectam. A dosagem do ácido nucleico a ser administrado pode ser alterada. Tipicamente, o ácido nucleico é administrado numa quantidade na gama de 1 pg a 1 mg, de um modo preferido 1 pg a 10 µg de ácido nucleico para transferência génica mediada por partículas e 10 µg a 1 mg para outras vias.

Uma sequência de ácido nucleico da presente invenção pode também ser administrada através de vectores de transferência especializados, úteis em terapia génica. As abordagens de terapia génica são discutidas, por exemplo, por Verme *et al*, Nature 1997, **389**: 239-242. Podem ser utilizados sistemas de vector tanto viral como não viral. Os sistemas baseados em vírus incluem sistemas baseados em retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associado, vírus herpes, Canarypox e vírus de vacínia. Os sistemas não baseados em vírus incluem a administração directa de ácidos nucleicos, tecnologia de encapsulação de microesfera (poli(lactido-co-glicolido) e, sistemas baseados em lipossomas. Os sistemas de transferência virais e não virais podem ser combinados sempre que for desejável proporcionar injecções de reforço após uma vacinação inicial, por exemplo, uma vacinação de ADN "principal" inicial utilizando um vector não viral, tal como um plasmídeo, seguida por uma ou mais vacinações de "reforço" utilizando um vector viral ou um sistema não baseado em vírus.

Uma sequência de ácido nucleico da presente invenção pode também ser administrada através de células transformadas. Essas células incluem células recolhidas de um indivíduo. O

polinucleótido simples ou o vector da presente invenção pode ser introduzido nessas células *in vitro* e as células transformadas podem ser posteriormente retornadas ao indivíduo. O polinucleótido da invenção pode integrar-se em ácidos nucleicos já presentes numa célula através de eventos de recombinação homóloga. Uma célula transformada pode, se desejado, ser cultivada *in vitro* e uma ou mais das células resultantes podem ser utilizadas na presente invenção. As células podem ser proporcionadas num sítio apropriado num doente através de técnicas cirúrgicas ou microcirúrgicas conhecidas (e. g., enxerto, microinjecção, etc.)

As células adequadas incluem células apresentadoras de抗igénio (APCs), tais como células dendríticas, macrófagos, célula B, monócitos e outras células que podem ser manipuladas para serem APCs eficientes. Essas células podem, mas não necessitam, ser modificadas geneticamente para aumentar a capacidade para apresentação do抗igénio, para melhorar a activação e/ou manutenção da resposta da célula T, para ter efeitos antitumorais, e. g., anti-carcinoma cervical, per se e/ou para serem imunologicamente compatíveis com o receptor (*i. e.*, haplotipo HLA condizente). As APCs podem geralmente ser isoladas a partir de qualquer de uma variedade de fluidos biológicos e órgãos, incluindo tecidos tumorais e peritumorais, e podem ser células autólogas, alógénicas, singénicas ou xenogénicas.

Determinadas formas de realização preferidas da presente invenção utilizam células dendríticas, ou suas progenitoras, como células apresentadoras de抗igénio, quer para transformação *in vitro* e retorno ao doente ou como o alvo *in vivo* de nucleótidos transferidos na vacina, por exemplo, através de transferência de ADN mediada por partículas. As

células dendríticas são APCs altamente potentes (*Banchereau e Steinman, Nature* 392:245-251, 1998) e foi demonstrado serem eficazes como um adjuvante fisiológico para induzir imunidade antitumoral profilática ou terapêutica (ver *Timmerman e Levy, Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999). Em geral, as células dendríticas podem ser identificadas com base na sua forma típica (estreladas *in situ*, com processos citoplasmáticos acentuados (dendrites) visíveis *in vitro*), na sua capacidade de incorporação, processamento e apresentação de抗énios com elevada eficiência e na sua capacidade para activar respostas naïve das células T. As células dendríticas podem, naturalmente, ser manipuladas para expressar receptores específicos de superfície celular ou ligandos que não são geralmente encontrados em células dendríticas *in vivo* ou *ex vivo*, por exemplo, o(s)抗énio(s) codificado(s) nas construções da invenção, e essas células dendríticas modificadas estão contempladas através da presente invenção. Como uma alternativa às células dendríticas, podem ser utilizadas vesículas carregadas de抗énio segregadas por células dendríticas (denominadas exossomas) dentro de uma vacina (ver *Zitvogel et al., Nature Med.* 4:594-600, 1998).

As células dendríticas e progenitoras podem ser obtidas a partir de sangue periférico, medula óssea, células infiltrantes tumorais, células infiltrantes de tecidos peritumorais, nódulos linfáticos, baço, pele, sangue do cordão umbilical ou qualquer outro tecido ou líquido adequado. Por exemplo, as células dendríticas podem ser diferenciadas *ex vivo* através de adição de uma combinação de citocinas, tais como GM-CSF, IL-4, IL-13 e/ou TNF a culturas de monócitos recolhidos a partir de sangue periférico. Alternativamente, células positivas a CD34 recolhidas a partir de sangue periférico, sangue do cordão umbilical ou medula óssea podem ser diferenciadas em células

dendríticas através da adição ao meio de cultura de combinações de GM-CSF, IL-3, TNF, ligando de CD40, lipopolissacárido LPS, ligando de flt3 (uma citocina importante na produção de células apresentadoras de抗原proissionais, particularmente células dendríticas) e/ou outro(s) composto(s) que induz(em) diferenciação, maturação e proliferação de células dendríticas.

As APCs podem geralmente ser transfectadas com um polinucleótido que codifica uma sequência antigénica de aminoácidos de HPV, tal como um polinucleótido de codão optimizado como considerado na presente invenção. Essa transfecção pode ocorrer *ex vivo*, e uma composição ou vacina compreendendo essas células transfectadas pode depois ser utilizada para objectivos terapêuticos, como aqui descritos. Alternativamente, um veículo de transferência génica dirigido a uma célula dendrítica ou outra apresentadora de抗原 pode ser administrado a um doente, resultando em transfecção que ocorre *in vivo*. A transfecção *in vivo* e *ex vivo* de células dendríticas, por exemplo, pode ser geralmente realizada utilizando quaisquer métodos conhecidos na técnica, tais como aqueles descritos no documento WO 97/24447, ou a abordagem mediada por partículas descrita por Mahvi *et al.*, *Immunology and cell Biology* 75:456-460, 1997.

As vacinas e composições farmacêuticas podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou multi-dose, tais como ampolas seladas ou frascos. Esses recipientes são, de um modo preferido, selados hermeticamente para preservar a esterilidade da formulação até à utilização. Em geral, as formulações podem ser armazenadas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos. Alternativamente, uma vacina ou composição farmacêutica pode ser armazenada num estado liofilizado, requerendo apenas a adição de um veículo líquido estéril imediatamente antes da utilização. As vacinas

compreendendo sequências de nucleótidos pretendidas para administração através da transferência mediada por partículas podem ser apresentadas como cartuchos adequados para utilização com um instrumento de administração de gás comprimido, o que neste caso os cartuchos podem consistir em tubos ocos, cuja superfície interna é revestida com partículas contendo a sequência de nucleótidos da vacina, opcionalmente na presença de outros ingredientes farmaceuticamente aceitáveis.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem incluir compostos adjuvantes, ou outras substâncias que podem servir para modular ou aumentar a resposta imunológica induzida pela proteína que é codificada pelo ADN. Estes podem ser codificados pelo ADN, quer separadamente de, ou como uma fusão com o抗原, ou podem ser incluídos como elementos não de ADN da formulação. Os exemplos de substâncias de tipo adjuvante que podem ser incluídos nas formulações da presente invenção incluem a ubiquitina, a proteína de membrana associada lisossomal (LAMP), o抗原 nuclear do vírus da hepatite B, o ligando flt3 e outras citocinas, tais como IFN- γ e GMCSF.

Estão comercialmente disponíveis outros adjuvantes adequados, tais como, por exemplo, Adjuvante Incompleto e Adjuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI); Imiquimod (3M, St. Paul, MN); Resimiquimod (3M, St. Paul, MN); Adjuvante 65 da Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadélfia, PA); sais de alumínio, tais como gel de hidróxido de alumínio (alúmen) ou fosfato de alumínio; sais de cálcio, ferro ou zinco; uma suspensão insolúvel de tirosina acilada; açúcares acilados; polissacáridos derivatizados cationicamente ou anionicamente; polifosfazenos; microesferas biodegradáveis; monofosforilo de lípido A e quil A. Também podem ser utilizadas como adjuvantes citocinas, tais como GM-CSF ou interleucina-2, -7 ou -12.

Nas formulações da invenção é preferido que a composição adjuvante induza uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th1. Assim, o adjuvante pode servir para modular a resposta imunológica produzida em resposta aos抗igenios codificados por ADN a partir de uma resposta predominantemente de tipo Th2 para uma predominantemente Th1. Níveis elevados de citocinas de tipo Th1 (e. g., IFN-, TNF, IL-2 e IL-12) tendem a favorecer a indução de respostas imunológicas mediadas por células a um抗igenio administrado. Dentro de uma forma de realização preferida, em que uma resposta é predominantemente de tipo Th1, o nível de citocinas de tipo Th1 aumentará em maior escala do que o nível de citocinas de tipo Th2. Os níveis destas citocinas podem ser prontamente avaliados utilizando ensaios convencionais. Para uma revisão das famílias de citocinas, ver Mosmann e Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

De acordo com o exposto, os adjuvantes adequados para utilização na indução de uma resposta predominantemente de tipo Th1 incluem, por exemplo, uma combinação de monofosforilo de lípido A, de um modo preferido monofosforilo de lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) conjuntamente com um sal de alumínio. Outros adjuvantes conhecidos que induzem preferencialmente uma resposta imunológica de tipo TH1 incluem oligonucleótidos contendo CpG. Os oligonucleótidos são caracterizados por o dinucleótilo de CpG ser não metilado. Esses oligonucleótidos são bem conhecidos e são descritos no, por exemplo, documento WO96/02555. As sequências de ADN imunoestimuladoras são também descritas, por exemplo, por Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Os oligonucleótidos contendo CpG podem ser codificados separadamente do(s)抗igenio(s) de papiloma na mesma ou numa construção diferente de polinucleótidos, ou podem estar imediatamente adjacentes a este, e. g., como uma fusão com este. Alternativamente, os oligonucleótidos contendo CpG podem ser

administrados separadamente, i. e., não como parte da composição que inclui o抗原 codificado. Os oligonucleótidos de CpG podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com outros adjuvantes. Por exemplo, um sistema intensificado envolve a combinação de um oligonucleótido contendo CpG e um derivado de saponina, particularmente a combinação de CpG e QS21 como divulgado nos documentos WO 00/09159 e WO 00/62800. De um modo preferido, a formulação compreende adicionalmente uma emulsão de óleo em água e/ou tocoferol.

Um outro adjuvante preferido é uma saponina, de um modo preferido QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), que pode ser utilizado isoladamente ou em combinação com outros adjuvantes. Por exemplo, um sistema intensificado envolve a combinação de um monofosforilo de lípido A e derivado de saponina, tal como a combinação de QS21 e 3D-MPL como descrita no documento WO 94/00153, ou uma composição menos reactogénica em que a QS21 é anulada com colesterol, como descrito no documento WO 96/33739. Outras formulações preferidas compreendem uma emulsão de óleo em água e tocoferol. Uma formulação adjuvante particularmente potente envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol numa emulsão óleo em água é descrita no documento WO 95/17210.

Outros adjuvantes preferidos incluem Montanide ISA 720 (Seppic, França), SAF (Chiron, Califórnia, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), Detox (Ribi, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) e outros aminoalquilglucosaminida-4-fosfatos (AGPs).

Outros adjuvantes preferidos incluem moléculas adjuvantes da fórmula geral (I)

Fórmula (I): HO(CH₂CH₂O)_n-A-R

em que, n é 1-50, A é uma ligação ou -C(O)-, R é alquilo C1-50 ou Fenilalquilo C1-50.

Uma forma de realização da presente invenção consiste numa formulação compreendendo um éter de polioxietileno de fórmula geral (I), em que n está entre 1 e 50, de um modo preferido 4-24, de um modo muito preferido 9; o componente R é C1-50, de um modo preferido alquilo C4-C20 e de um modo muito preferido alquilo C12, e A é uma ligação. A concentração dos éteres de polioxietileno deve estar na gama de 0,1-20%, de um modo preferido a partir de 0,1-10%, e de um modo muito preferido na gama de 0,1-1%. Os éteres de polioxietileno preferidos são seleccionados do seguinte grupo: éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-9-estearílico, éter polioxietileno-8-estearílico, éter polioxietileno-4-laurílico, éter polioxietileno-35-laurílico e éter polioxietileno-23-laurílico. Os éteres de polioxietileno, tais como o éter polioxietileno-laurílico são descritos no índice Merck (12^a edição: entrada 7717). Estas moléculas adjuvantes são descritas no documento WO 99/52549. O éter de polioxietileno de acordo com a fórmula geral (I) acima pode, se desejado, ser combinado com outro adjuvante. Por exemplo, uma combinação adjuvante preferida é, de um modo preferido, com CpG como descrito no pedido pendente de patente Britânica GB 9820956.2.

Nos casos em que a vacina inclui um adjuvante, a formulação de vacina pode ser administrada em duas partes. Por exemplo, a parte da formulação contendo a construção de nucleótidos que codifica o antigénio pode ser administrada primeiro, e. g., por injecção subcutânea ou intramuscular, ou por transferência intradérmica mediada por partículas, depois a parte da formulação contendo o adjuvante pode ser administrada

subsequentemente, quer imediatamente ou depois de um período de tempo adequado que será evidente ao médico especialista na técnica das vacinas. Sob estas circunstâncias, o adjuvante pode ser administrado através da mesma via que a formulação antigénica ou através de uma via alternativa. Noutras formas de realização, a parte adjuvante da formulação será administrada antes da parte antigénica. Numa forma de realização, o adjuvante é administrado como uma formulação tópica, aplicada à pele no local da transferência mediada por partículas das sequências de nucleótidos que codificam o(s) antigénio(s), quer antes ou depois da sua transferência mediada por partículas.

Os seguintes Exemplos servem para ilustrar adicionalmente a invenção, com referência aos desenhos em anexo, em que:

Figura 1 mostra as sequências de aminoácidos de tipo selvagem protótipas de E1 dos tipos 11, 6a e 6b de HPV, derivadas do Genbank;

Figura 2 mostra a sequência de aminoácidos de tipo selvagem protótipa de HPV6b E1 da Fig. 1 (6b-e1) alinhada com a sequência de aminoácidos de HPV6b E1 incluindo mutações pontuais para remover a actividade biológica (6b-e1 mut);

Figura 3 mostra as sequências de aminoácidos de tipo selvagem protótipas de E2 dos tipos 11, 6a e 6b de HPV, derivadas do Genbank;

Figura 4a mostra a sequência de aminoácidos de tipo selvagem protótipa de HPV11 E2 da Fig. 3 (Hpv-11e2-wt) alinhada com a sequência de aminoácidos de HPV11 E2 incluindo uma mutação pontual para remover a actividade biológica (HPV-11 e2-mut) e com a sequência de aminoácidos

codificada pela sequência de nucleótidos da Fig. 6 (HPV-11e2-comut);

Figura 4b mostra a sequência de aminoácidos de tipo selvagem protótipa de E2 HPV6b da Fig. 3 (Hpv-6be2-wt) alinhada com a sequência de aminoácidos de E2 HPV6b incluindo uma mutação pontual para remover a actividade biológica (HPV-6be2-mut);

Figura 5 mostra uma sequência de nucleótidos, que tem um perfil de utilização de codões que se assemelha àquele de um gene humano altamente expresso, codificando a sequência de aminoácidos mutada de HPV6b E1 da Fig. 2;

Figura 6 mostra uma sequência de nucleótidos, que tem um perfil de utilização de codões que se assemelha àquele de um gene humano altamente expresso, codificando a sequência de aminoácidos mutada de HPV11 E2 da Fig. 4;

Figura 7 mostra o vector de ADN p7313-PLc;

Figura 8 mostra amostras de lisados celulares do Exemplo 4, após migração em gel de acrilamida e coloração para mostrar ligação do anticorpo à proteína E1 expressa;

Figura 9 mostra respostas celulares a desafio de antigénio após imunização de murganhos com um polinucleótido de acordo com a invenção (Exemplo 6); e

Figura 10 mostra amostras de lisados celulares do Exemplo 7, após migração em gel de acrilamida e coloração para mostrar ligação do anticorpo à proteína E2 expressa.

Exemplo 1 - Optimização de Codão de HPV6bE1

A sequência de aminoácidos de tipo selvagem protótipa de HPV6b E1, obtida do Genbank, é apresentada na Fig.1 (sequência inferior). Esta figura mostra o elevado nível de homologia para esta proteína entre as sequências protóticas do vírus de HPV dos tipos 11, 6a e 6b. De modo semelhante, a Figura 3 apresenta as sequências de aminoácidos de tipo selvagem protóticas para a proteína E2 de HPV11, 6a e 6b. É esperado que uma terapia imunológica (vacina terapêutica) utilizando sequências de HPV6b irá reagir de forma cruzada para proporcionar uma resposta imunológica profilática ou terapêutica contra todos os três tipos virais.

A utilização de codões da sequência de HPV6b E1 foi comparada àquela de genes altamente expressos humano e *E. coli* e verificou-se ter um baixo coeficiente de utilização de codões para ambas as espécies. Simplesmente utilizando o codão mais abundante para cada resíduo de aminoácido resultaria também num perfil de utilização de codões falseado, uma vez que nenhum organismo utiliza exclusivamente o seu codão mais preferido para um determinado aminoácido. Consequentemente, os codões foram atribuídos utilizando um método estatístico para produzir um gene sintético que tem uma frequência de codões mais próxima da encontrada naturalmente em genes altamente expressos de *E. coli* e humanos.

Os codões no gene sintético foram atribuídos utilizando um programa Visual Basic denominado Calcgene, escrito por R. S. Hale e G Thompson (Protein Expression and Purification Vol. 12 pp.185-188 (1998)). Para cada resíduo de aminoácido na sequência original, foi atribuído um codão baseado na probabilidade dele aparecer em genes altamente expressos de *E. coli*. Os detalhes do programa, que trabalha sob Microsoft Windows 3.1, podem ser

obtidos a partir dos autores. Porque o programa aplica um método estatístico para atribuir codões ao gene sintético, nem todos os codões resultantes são os mais frequentemente utilizados no organismo alvo. De preferência, a proporção de codões frequentemente e infrequentemente utilizados do organismo alvo é reflectida na sequência sintética através da atribuição de codões nas proporções correctas. Contudo, uma vez que não existe nenhuma regra firme-e-rápida para atribuir um codão particular a uma posição particular na sequência, cada vez que é o programa é utilizado produzirá um gene sintético diferente - embora cada um tenha o mesmo perfil de utilização de codões e cada irá codificar a mesma sequência de aminoácidos. Se o programa for utilizado diversas vezes para uma determinada sequência de aminoácidos e um determinado organismo alvo, serão produzidas várias sequências de nucleótidos diferentes que podem diferir no número, tipo e posição dos sítios de restrição, sinais de *splicing* de intrão, etc., alguns dos quais podem ser indesejáveis. O especialista será capaz de seleccionar uma sequência apropriada para utilização na expressão do polipéptido com base nestas características.

Além disso, uma vez que os codões são atribuídos aleatoriamente numa base estatística, é possível (embora talvez improvável) que dois ou mais codões que sejam relativamente raramente utilizados no organismo alvo possam ser aglomerados em intima proximidade. Acredita-se que esses aglomerados podem perturbar a maquinaria de tradução e resultar em taxas de expressão particularmente baixas, de modo que o algoritmo para a escolha dos codões no gene optimizado excluiu quaisquer codões com um valor de RSCU menor de 0,2 para genes altamente expressos de modo a prevenir quaisquer aglomerados de codões raros de serem fortuitamente seleccionados. A distribuição dos codões restantes foi depois alocada de acordo com as frequências para genes altamente expressos de *E. coli* para produzir uma

distribuição global dentro do gene sintético que se assemelhe àquela de genes de *E. coli* (coeficiente = 0,85) e também àquela de genes humanos altamente expressos (coeficiente = 0,50). Um processo semelhante foi utilizado para obter uma sequência de nucleótidos de codões optimizados para HPV11 E2, excepto que foi utilizado Syngene (Peter Ertl, não publicado), uma versão melhorada do programa Calcgene que permite que seja opcional a exclusão de codões raros, para alocar codões de acordo com o perfil de frequência de codões de genes humanos altamente expressos. Ao contrário da atribuição de codões para E1, não foram excluídos codões raros. Ao mesmo tempo, foi realizada uma alteração de oligonucleótidos para codificar uma alteração de aminoácidos K111A, como descrita abaixo.

As mutações foram introduzidas nos genes E1 e E2 de codão optimizado para originar mutações pontuais nas sequências de aminoácidos de E1 (K83G, R84G e G483D) e E2 (K111A). As sequências de aminoácidos dos genes mutados são mostradas (alinhadas com a sequência de tipo selvagem protótipa) nas Figs. 2 (HPV6bE1) e 4 (HPV6bE2 e HPV11E2). A sequência de nucleótidos de codão optimizado e mutada para HPV6b E1 é mostrada na Fig. 5. A sequência de nucleótidos de codão optimizado e mutada para HPV11 E2 é mostrada na Fig. 6. Na Figura 4, a sequência de aminoácidos do polipéptido obtido por expressão do gene HPV11E2 de codão optimizado e mutado é também apresentada, em alinhamento com as sequências de tipo selvagem protótipas e de tipo selvagem mutadas, para mostrar que a optimização de codão da sequência de nucleótidos não altera a sequência de aminoácidos codificada (que é idêntica à sequência de tipo selvagem mutada).

Exemplo 2 - Construção da Sequência de Polinucleótidos HPV6b
E1 de Codão Optimizado

Concepção Génica:

Utilizando o software de optimização discutido acima, foram calculados oligonucleótidos de 40 oligómeros sobrepostos a partir da sequência optimizada. Os oligonucleótidos terminais contendo os sítios de restrição foram de 60 oligómeros. Os oligonucleótidos foram encomendados à Life Technologies Ltd numa concentração de 50 nmole, desprotegidos e não fosforilados.

Montagem de oligonucleótido:

Cada oligonucleótido foi dissolvido em água bidestilada para uma concentração final de 100 micromolar (μM) e foi preparada uma mistura igual de todos os 96 oligonucleótidos a 100 μM . A síntese foi preparada como se segue, utilizando Pwo polimerase da Roche Boehringer (Cat N° 1644955).

Água bidestilada	86 μL
Tampão Pwo 10X	10 μL
mistura de dNTP	1 μL (mistura igual de dNTPs a 100 mM)
mistura de oligo	1 μL (mistura igual de oligos a 100 μM)
Polimerase Pwo	2 μL .

Foi realizada uma Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) na mistura de reacção acima num Trio Thermoblock (Biometra) utilizando as seguintes condições:

1. 40 °C 2 min
2. 72 °C 10 seg
3. 94 °C 15 seg
4. 40 °C 30 seg
5. 72 °C 20 seg + 2 seg por ciclo
6. 4 °C ∞

Ciclo repetido 25 vezes entre os passos 3 e 5.

Após conclusão de 25 ciclos, foi removida uma fracção de 10 µL de cada tubo e submetida a migração num gel de agarose Tris Acetato (TAE) a 0,8% e observada sob luz UV de comprimento longo. O tamanho previsto do ADN de E1 sintetizado deve ser aprox. 2kb.

Recuperação Genica:

O gene sintético foi recuperado por PCR utilizando polimerase, utilizando os dois oligos terminais que continham um sítio de restrição Not 1 no terminal N do oligo sintético e um sítio Bam H1 no terminal C do oligo sintético.

Água bidestilada	65 µL
Tampão Pwo 10X	10 µL
mistura de dNTP	1 µL (mistura igual de dNTPs a 100 mM)
mistura de montagem	20 µL (da PCR anterior)

Oligo do terminal N 1 µL (100 µM)
Oligo do terminal C 1 µL (100 µM)
Polimerase Pwo 2 µL.

1. 94 °C 45 seg
2. 72 °C 2 min + 1 min por 500 pb
3. 72 °C 10 min
4. 4 °C ∞

Ciclo repetido 25 vezes entre os passos 2 e 1.

O produto de PCR foi depois purificado utilizando um kit de purificação de PCR QIAquick (Cat N° 28104 da Qiagen) antes do ADN ser ressuspenso num total de 50 µL de tampão de eluição do kit. Uma fracção de 10 µL foi digerida com as enzimas de restrição Not 1 e BamH1 (da Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, Escócia) durante 2 horas a 37 °C. Esta digestão foi purificada em gel em 0,8% de gel de agarose TAE e o produto de ADN de 2 kb foi excisado e extraído utilizando um kit de extracção de gel QIAquick (Cat N° 28704 da Qiagen). O fragmento de ADN puro digerido final foi eluído num total de 50 µL de tampão de eluição do kit.

Este fragmento de PCR foi clonado no vector p7313PLc (Fig. 7), (Powderject Vaccines Inc., ver mais detalhes abaixo) e transformado em células JM109 competentes (Cat N° P9751 da Promega). O ADN plasmídico de clones seleccionados foi verificado por enzimas de restrição através de digestão com NcoI-BamH1 e NcoI-EcoR1. Foram seleccionados cinco clones correctos com inserções de fragmento de 2 kb e foi sequenciado o ADN da inserção. Foi seleccionado para utilização adicional, um clone com uma inserção contendo apenas três mutações pontuais.

As três mutações pontuais foram corrigidas através de troca de ligação com fragmentos pequenos homólogos de outros clones.

O clone corrigido foi novamente verificado por enzimas de restrição através de digestão e foi totalmente sequenciado o ADN da inserção. Este clone foi designado p6bE1c/o. Ao mesmo tempo, e para estudos de expressão comparativa e imunização, o gene HPV-6b E1 de tipo selvagem, e o gene HPV-11 E1 de tipo selvagem foram amplificados por PCR de clones genómicos de HPV-6b, (EMBO J. 2 (12) 2314-2318 1983) e HPV-11 (Virology 151, 124-130 1986), e os fragmentos respectivos clonados em vector p7313PLc digerido com Not 1 - BamH1. Estes clones foram designados p6bE1w/t e p11E1w/t, respectivamente.

Os genes E1 nos clones p6bE1c/o e p6bE1w/t foram ainda mutados para introduzir alterações de aminoácidos K83G, R84G e G438D. Foram utilizados iniciadores oligonucleotídicos 3' e 5' emparelhados por sequenciação, com substituições de nucleótidos concebidas para introduzir as mutações requeridas, em reacções de PCR com outros reagentes de kit através dos métodos descritos no kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Cat N° 200518 da Stratagene). Os clones mutados P6bE1c/o e p6bE1w/t foram designados p6bE1c/o mut e p6bE1w/t mut, respectivamente.

Exemplo 3 - Construção da Sequência de Polinucleótidos HPV11 E2 de Codão Optimizado

A concepção, montagem e recuperação do gene E2 de codão optimizado foi como descrita acima para E1, mas os oligonucleótidos de sobreposição tinham 60 nucleótidos de comprimento em vez de 40, com uma sobreposição de 18 nucleótidos. Ao contrário do processo de E1, foi produzido um clone contendo a mutação de aminoácido K111A ao mesmo tempo que

o clone do gene E2 de codão optimizado, através de substituição dos dois oligonucleótidos da sequência de tipo selvagem apropriados com dois oligonucleótidos de 60 oligómeros que conjuntamente compreendem a substituição de nucleótido requerida para produzir a alteração de K111A.

Composição do plasmídeo p7313-PLC

O plasmídeo foi construído através de substituição do gene da beta-lactamase contendo o fragmento Eam11051 - PstI de pUC19 (disponível a partir da Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, HP7 9NA) com um fragmento EcoRI de pUC4K (Amersham-Pharmacia) contendo o gene de resistência à Canamicina, no seguimento do preenchimento de extremidades de ambos os fragmentos utilizando T4 ADN polimerase. O promotor/intensificador IE1 de Citomegalovírus humano, Intrão A, foi derivado do plasmídeo JW4303 obtido da Dra. Harriet Robinson, University of Massachusetts, e introduzido no sítio SalI de pUC19, como um fragmento XhoI - SalI, incorporando o sinal de poliadenilação da hormona do crescimento de bovino. A deleção do fragmento SalI-BanI 5' do promotor produziu o promotor mínimo utilizado no vector (documento WO00/23592 - Powderject Vaccines Inc.). A 3'UTR do antigénio de superfície de HBV foi derivado do Vírus da Hepatite B, serotipo adw, no vector pAM6 (Moriarty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2606-2610, 1981). O pAM6 (vector baseado em pBR322) foi obtido a partir da American Type Culture Collection, número de catálogo ATCC 45020. A 3'UTR foi introduzida a 5' relativamente ao sinal de poliadenilação como um fragmento BamHI de 1,4kb, de extremidades tornadas rombas para inserção de modo a remover os sítios BamHI. Numa série de passos (incluindo digestão com *Bgl* II, tratamento com Klenow polimerase, digestão com *Bst*X I, digestão com *Nco* I, tratamento com nuclease de

feijão mung para remover saliências e digestão adicional com *BstX* I), foram realizadas modificações à região entre a região do intensificador não traduzida 3' do gene de HBV S e o sinal bGHpA para remover todas as grelhas de leitura aberta superiores a 5 codões entre o promotor do gene X e o sinal bGHpA. Isto resultou na deleção da sequência que codifica a porção traduzível da proteína X (9 aminoácidos) e o codão de iniciação do gene X. Contudo, a fraca região intensificadora/promotora do gene X foi retida porque se verificou que esta região intensifica a expressão de HBsAg a partir do promotor CMV. O sinal de poliadenilação da hormona do crescimento de bovino foi substituído com o sinal de poliadenilação da beta globina de coelho. As sequências não codificantes 5' e codificantes do抗ígenio S foram excisadas e substituídas com um ligante oligonucleotídico para proporcionar sítios de múltipla clonagem como mostrado para produzir o plasmídeo p7313-PL.

Hind	---NotI---	-EcoRV	--NdeI--	--BamHI
AGCTTGCGGCCGCTAGCGATATCGGTACCATATGTCGACGGATCC.....				
....ACGCCGGCGATCGCTATAGCCATGGTCTACAGCTGCCTAGGCCGG				
	--NheI--	--KpnI--	--SalI--	ΔNotI

A sequência cer de ColE1 foi obtida a partir de um subclone do plasmídeo pDAH212 de David Hodgeson (Warwick University) e amplificada por PCR utilizando iniciadores para colocar sítios de restrição EcoRI nas extremidades da sequência. A sequência cer foi depois introduzida no sítio EcoRI de p7313-PL para produzir o plasmídeo p7313-PLc (Fig. 7). A sequência do cer amplificado foi verificada contra a entrada M11411 do Genbank.

Exemplo 4 - Expressão de E1 em células 293T de mamífero

As células 293T de mamífero foram cultivadas até fase exponencial numa concentração final de 2×10^5 células por placa de cultura de tecidos Corning Costar™ de 6 poços (Corning Science Products, 10 The ValleyCentre, Gordon Road, High Wycombe, Bucks, RU) de um dia para o outro a 37 °C em 5% de CO₂. Foi preparada a seguinte mistura de transfecção e complexada durante 25 minutos:

2 µg de ADN plasmídico (vector, p6bE1c/o, p6bE1w/t) em 16 µL de água bidestilada estéril

mais:

OPTI-mem™ (Gibco BRL, Paisley, Escócia)	8 µL
Lipofectamine™ (GibcoBRL)	6 µL.

Cada monocamada de células foi lavada cuidadosamente duas vezes com OPTI-mem™. Foram adicionados 800 µL de OPTI-mem™ a cada poço. Foram adicionados 200 µL de OPTI-mem™ a cada mistura de transfecção, misturados e adicionados cuidadosamente a uma monocamada de células. A placa foi incubada durante 5 horas a 37 °C em 5% de CO₂, após o que a mistura de transfecção e o OPTI-mem™ foram rejeitados. As monocamadas de células foram lavadas cuidadosamente duas vezes com meio de cultura de células e as células finalmente transfectadas foram incubadas durante 24 horas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco contendo 10% de soro fetal da vitela e 29,2 mg/mL de L-glutamina a 37 °C em 5% de CO₂. As células foram removidas por raspagem para microtubos, lavadas duas vezes com PBS, centrifugadas e o sedimento celular foi ressuspenso em corante de SDS Page de Laemmli. Os sedimentos celulares foram fervidos e carregados num gel de SDS Page a 10% e submetidos a electroforese em tampão Tris Glicina SDS a 1X. Após electroforese, o gel foi transferido para membrana de Nitrocelulose (Amersham) e submetido a transferência de Western. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 5% de Marvel™

(Premier Beverages, Knighton, Adbaston, Stafford, RU) em PBS durante 30 min à temperatura ambiente e lavada duas vezes com PBS e 0,1% de Tween 20. Um anticorpo policlonal produzido em coelhos contra a sequência proteica do terminal C de HPV6bE1 (sequência de proteína: CSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFR) foi diluído em 5% de Marvel™ em PBS e adicionado à membrana de nitrocelulose. Isto foi incubado à temperatura ambiente durante 1 hora com agitação suave. O anticorpo diluído foi removido e a membrana lavada três vezes com PBS e 0,1% de Tween 20. Um conjugado secundário, anti-peroxidase de rábano de coelho, de porco (HRP) (DAKO), foi diluído 1:20000 em PBS e 0,1% de Tween 20. Isto foi adicionado à membrana lavada e incubado com agitação suave à temperatura ambiente durante 1 hora. A membrana foi depois exaustivamente lavada com PBS e 0,1% de Tween 20. Foi utilizado um kit de Chemiluminescent HRP (Amersham) para detectar as proteínas transferidas na membrana.

Resultados:

O tamanho previsto de uma proteína traduzida de E1 é 68 kDa - 72 kDa. Os resultados (Fig. 8) mostram um tamanho correcto de proteína expressa por p7313-PLc contendo o HPV6bE1 de codão optimizado (pista 4). O vector contendo E1 de tipo selvagem está na pista 3, que mostra que não se verificou expressão detectável de E1 em células humanas a partir da sequência de nucleótidos de tipo selvagem. De modo semelhante, não é detectado E1 na pista 2 (vector vazio) e pista 1 (células não transfectadas). A banda de aprox. 60 kD nas pistas 1-4 é uma proteína celular não identificada que apresenta reacção cruzada com o anticorpo anti-E1. A banda apresenta, aproximadamente, intensidade constante ao longo das pistas, mostrando que o carregamento das amostras foi consistente.

Exemplo 5 - Construção de Vírus de Vacínia recombinante Expressando as proteínas HPV E1 e HPV E2.

O vírus de Vacínia expressando a proteína HPV-6b E1 foi construído na Glaxo Wellcome, Stevenage, RU. Os vírus de Vacínia expressando HPV-11 E1 e HPV-11 E2 foram um amável presente de Jeff Engler, University of Alabama em Birmingham, E.U.A.

Resumidamente, o gene E1 de p6bE1w/t foi clonado no vector pTM3 do vírus de Vacínia e depois o vector recombinante, verificado por enzimas de restrição e ADN sequenciado, foi utilizado para transfecção de células HTk⁻. O vírus de Vacínia recombinante foi isolado e purificado em placa. A expressão da proteína E1 foi verificada através de transferência de Western utilizando anti-soros peptídicos após infecção de células permissivas tanto com o vírus recombinante expressando HPV-6b E1 como com um segundo vírus de Vacínia (vTF7-3) expressando a ARN polimerase de bacteriófago T7. A Co-infecção de células com vírus Vacínia vFT7-3 é também necessária de modo a dirigir a expressão da proteína E1 e E2 a partir dos vírus de Vacínia recombinantes HPV-11 E1 e E2. A estirpe WR do vírus de Vacínia foi utilizado em experiências de controlo negativo. O vector pTM3 e o vírus vTF7-3 foram do National Institute of Health, Maryland, E.U.A.

Exemplo 6 - Imunologia - detecção de respostas celulares aos抗ígenos de HPV

Todos os reagentes foram obtidos da Gibco BRL, Paisley, Escócia ou Sigma, Poole, Dorset, salvo referência em contrário.

A. protocolo de Imunização.

Foram imunizados murganhos fêmea C57BU6 com 1,0-2,0 µg de ADN (quer p6bE1c/o, p6bE1w/t, p6bE1c/o mut, p6bE1w/t mut ou plasmídeo p7313PLc vazio) através de PMDD e reforçados com uma dose idêntica 14 dias mais tarde. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os baços removidos para investigação das respostas celulares aos抗énios de HPV.

B. Preparação de suspensão de células isoladas de esplenócitos.

Os baços foram "esmagados" entre lâminas de vidro (BDH), os glóbulos vermelhos lisados (155 mM de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, 0,1 mM de EDTA) e as células ressuspensas em RPMI completo. (meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal de vitela de (FCS), 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol).

C. Infecção de células MC57 alvo.

Os epitopos imunodominantes derivados de抗énios de HPV permanecem indefinidos, deste modo a detecção de respostas específicas de抗énio *in vitro* baseia-se no processamento natural do抗énio inteiro produzido dentro das células alvo que foram transfetadas com ADNc codificando a(s) proteína(s) inteira(s). As células MC57 (K^b positivas) foram infectadas com vírus de vacínia recombinante expressando HPV-6b E1, HPV-11 E2 ou HPV-11 E1 utilizando uma multiplicidade de infecção de 5 durante 1 hora a 37 °C. O excesso de vírus foi removido por lavagem e as células ressuspensas em RPMI completo contendo 50 ng/mL de IL-2 humana recombinante (Glaxo Wellcome, Genebra).

D. ELISPOT.

As placas ELISPOT (96 poços, Millipore MAIP S 45 1 0) foram revestidas com anti-IFN gama de murganho, de rato (Pharmingen 18181D) a 15 µg/mL em PBS, de um dia para o outro (4 °C) antes da adição de 4x10e5 esplenócitos obtidos de grupos experimentais. O antígeno foi apresentado através da adição de 1x10e4 células MC57 infectadas com vacínia recombinante. A estirpe WR de vacínia de tipo selvagem foi utilizada como um controlo negativo. O ensaio foi incubado de um dia para o outro a 37 °C (5% de CO₂).

No dia 2 do ensaio, foram detectadas células formadoras de manchas utilizando anti-IFN gama de murganho biotinilado, de rato (Pharmingen 18112D) a 1 µg/mL, seguido por conjugado de fosfatase alcalina e estreptavidina (TCS biologicals SA 1008) numa diluição de 1/1000 em PBS. Isto foi visualizado utilizando um kit de substrato da fosfatase alcalina (Biorad 170-6432) e quantificado por análise de imagem. Os resultados são mostrados na Fig. 9.

Como pode ser observado a partir da Fig. 9, foi observada uma forte resposta celular a partir de todos os três murganhos vacinados com plasmídeo codificando a sequência E1 de HPV-6b de codão optimizado, quando desafiados com E1 transportado no vector de vacínia (vac.E1(11) ou vac.E1(6b)). Não foi observada resposta quando estes murganhos foram desafiados com vacínia de tipo selvagem (vac.WT), ou com vacínia expressando HPV-11 E2 (vac.E2(11)). Em contraste, a vacinação de murganhos com plasmídeo codificando a sequência E1 de tipo selvagem não resulta numa resposta de células T. Os esplenócitos destes murganhos não reagem ao desafio de vacínia transportando o gene E1, nem a qualquer outro desafio (dados não mostrados). A mutação do gene E1 não altera a resposta celular nos murganhos.

Além disso, uma vez que murganhos imunizados com p6bE1 c/o e p6bE1 c/o mut produziram fortes respostas imunológicas celulares contra células alvo infectadas com um vírus Vacínia expressando a proteína E1 de HPV-11, pode-se assumir que existe um elevado nível de reactividade cruzada imunológica entre HPV-6b E1 e HPV-11 E1. Os murganhos vacinados com vector p7313-PLc vazio não apresentaram resposta a qualquer desafio.

Exemplo 7 - Expressão de HPV 6b E2 em células 293T de mamífero

Monocamadas de células 293T (80% de confluência) em placas de 24 poços foram transfetadas com 1 µg de cada plasmídeo (p6bw/t, p6bc/o, p6bw/t mut, p6bc/o mut) utilizando 2,5 µL de Lipofectamine 2000 (Life Technologies) por transfecção, seguindo o protocolo convencional (ver Exemplo 4, acima). Após 24 horas da transfecção, as células foram recolhidas, lavadas em soro fisiológico tamponado com fosfato e examinadas por SDS-PAGE e transferência de Western utilizando um anti-soro anti-péptido E2 (#1100) produzido contra a sequência de aminoácidos MEAIAKRLDACQEQLLELYEEC do terminal N de HPV-6b (Fig. 10).

Resultados

Os resultados mostram uma importante banda de proteína do tamanho previsto (40 kd - 45 kD) na pista 3 (E2 de codão optimizado) e na pista 5 (E2 de codão optimizado e mutada). Uma fraca banda do mesmo tamanho aparece também na pista 4, indicando alguma expressão de nível muito baixo a partir do plasmídeo de E2 de tipo selvagem mutada, mas não na pista 1 (controlo negativo), ou na pista 2 (proteína E2 de tipo selvagem). Uma banda de reacção cruzada de ~25 kd aparece em

todas as pistas indicando um carregamento igual de lisados proteicos. A mutação de E2 não parece comprometer a expressão da proteína E2 que está significativamente melhorada por optimização de codão.

Lisboa, 21 de Fevereiro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Sequência de polinucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos do vírus do papiloma humano de um antigénio Precoce de HPV, ou seu fragmento, sendo o referido polinucleótido capaz de produzir uma resposta imunológica quando administrado *in vivo*, caracterizada por o referido polinucleótido ter um coeficiente de utilização de codões superior a 0,5 mas inferior a 1,0 para um gene humano altamente expresso.
2. Sequência de polinucleótidos de acordo com qualquer uma da reivindicação 1 que é uma sequência de ADN.
3. Sequência de polinucleótidos de acordo com a reivindicação 1 ou 2 que codifica um polipéptido de HPV de um tipo ou subtipo de HPV associado com o cancro cervical, verrugas cutâneas benignas ou verrugas genitais.
4. Sequência de polinucleótidos de acordo com a reivindicação 3 que codifica um polipéptido de HPV de um dos tipos 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 49, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.
5. Sequência de polinucleótidos de acordo com 4 que codifica um polipéptido de HPV de um tipo ou subtipo de HPV que é associado com cancro cervical ou verrugas genitais.
6. Sequência de polinucleótidos de acordo com a reivindicação 5 que codifica um polipéptido de HPV de um dos tipos 6, 11, 16, 18, 33 ou 45, ou uma fusão de dois ou mais polipéptidos

de um ou mais dos tipos 6, 11, 16, 18, 33 ou 45 do vírus HPV.

7. Sequência de polinucleótidos de acordo com a reivindicação 5 que codifica um polipéptido de HPV de um tipo ou subtípo de HPV seleccionado de HPV 11, 6a ou 6b.
8. Sequência de polinucleótidos de acordo com qualquer reivindicação anterior que codifica um polipéptido de HPV E1 mutado que tem as seguintes mutações K83G, R84G e G483D.
9. Sequência de polinucleótidos de acordo com quaisquer reivindicações de 1 a 7 que codifica um polipéptido de HPV E2 mutado compreendendo uma mutação de KIIIA.
10. Sequência de polinucleótidos de acordo com qualquer reivindicação anterior, no qual o polipéptido de HPV codificado compreende todo, ou uma parte de, um produto génico precoce de HPV.
11. Sequência de polinucleótidos de acordo com a reivindicação 9, em que o polipéptido de HPV codificado compreende todo, ou uma parte do, E1 ou E2, ou uma fusão do todo, ou uma parte do, E1 ou E2 com um outro polipéptido de HPV.
12. Sequência de polinucleótidos de acordo com qualquer reivindicação anterior tendo um coeficiente de utilização de codões para genes de *E. coli* superior a 0,6.
13. Sequência de polinucleótidos como apresentada em (SEQ ID N° 10, fig. 5), ou um seu fragmento ou análogo que retém a sua utilização de codão.

14. Sequência de polinucleótidos como apresentada em (SEQ ID N° 11, fig. 6), ou um seu fragmento ou análogo que retém a sua utilização de codão.
15. Vector de expressão compreendendo uma sequência de polinucleótidos, de acordo com qualquer reivindicação anterior, ligada operativamente a uma sequência de controlo que é capaz de proporcionar a expressão da sequência de polinucleótidos através de uma célula hospedeira.
16. Vector de expressão de acordo com a reivindicação 15 que é capaz de dirigir a expressão da sequência de polinucleótidos em células bacterianas, de insecto ou de mamífero.
17. Vector de expressão de acordo com a reivindicação 15 ou reivindicação 16, em que o esqueleto do vector é o p7313PLc como mostrado na figura 7.
18. Célula hospedeira compreendendo uma sequência de polinucleótidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14.
19. Célula hospedeira compreendendo um vector de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17.
20. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 18 ou reivindicação 19 que é uma célula bacteriana, mamífero ou insecto.
21. Composição farmacêutica compreendendo uma sequência de polinucleótidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14.

22. Composição farmacêutica compreendendo um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17.
23. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 21 ou reivindicação 22 compreendendo uma pluralidade de partículas, de um modo preferido partículas de ouro, revestidas com ADN.
24. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, compreendendo um excipiente farmaceuticamente aceitável e o vector de ADN.
25. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 21-24, compreendendo ainda um adjuvante.
26. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25, em que o adjuvante é codificado como uma fusão com o polipeptído de HPV codificado pelo polinucleótido.
27. Utilização de um polinucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14 na preparação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de uma infecção de HPV.
28. Utilização de um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17 na preparação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de uma infecção de HPV.
29. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 e 28, na qual a infecção de HPV é uma infecção de um ou mais dos tipos 6, 11, 16 ou 18 de HPV.
30. Utilização de um polinucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17 na preparação de um medicamento

para o tratamento ou profilaxia de verrugas cutâneas (pele), verrugas genitais, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), displasia cervical, neoplasia intraepitelial cervical (CIN) ou cancro cervical.

Lisboa, 21 de Fevereiro de 2007

Fig. 1

Hpv11-el	1	60
	MADDSGTENEGSGCTGWFMVEAIVEHTTGTQISEDEEEEVEDSGYDMVDFIDDRHITQNS	
Hpv6a-el		
6b-el	MADDSGTENEGSGCTGWFMVEAIVQHPTGTQISDDEEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
	61	120
Hpv11-el	VEAQALFNRQEADAHYATVQDLKRKYLGSPYVSPISNVANAVESEISPRLDAIKLTTOPK	
Hpv6a-el		
6b-el	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLKRKYLGSPYVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
	121	180
Hpv11-el	KVKRRLFETRELTDGYGYSEVEA..ATQVEKHGPENGDGQERDTGRDIEGEGVRE	
Hpv6a-el		
6b-el	KVKRRLFETRELTDGYGYSEVEAGTGTQVEKHGPENGDGQEKDTGRDIEG..EEHTE	
	181	240
Hpv11-el	AEAVDDSTREHADTSGILELLKCKDIRSTLKGFKDCFGGLSFVDLIRPFKSDRTTCADWV	
Hpv6a-el		
6b-el	AEAPTNVRREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGGLSFIDLIRPFKSDKTTCADWV	
	241	300
Hpv11-el	VAGFGIHHSIADAFQKLIEPLSLYAHIQWLNAWMVLLVLIRFKVNKSRCTVARTLGLT	
Hpv6a-el		
6b-el	VAGFGIHHSIASEAFQKLIEPLSLYAHIQWLNAWMVLLVLVRFKVNKSRCTVARTLATL	
	301	360
Hpv11-el	LNIPEHMLIEPPKIQSGVRALYWFRTGISNASTVIGEAPEWITRQTVIEWSLADSQFKL	
Hpv6a-el		
6b-el	LNIPEQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAPEWITRQTVIEWGLADSQFKL	
	361	420
Hpv11-el	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNSNMQAKYVKDCAIMCRHYKHAEM	
Hpv6a-el		
6b-el	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
	421	480
Hpv11-el	RKMSIKQWIKYRGTKVDGVNWKPIVQFLRHQNIEFIPFLSKLKLWLHGTPKKNCIAIVG	
Hpv6a-el		
6b-el	RKMSIKQWIKHRSKIEGTGNWKPIVQFLRHQNIEFIPFLSKFKLWLHGTPKKNCIAIVG	
	481	540
Hpv11-el	PPDTGKSCFCMSLIKFLGGTVISYVNSCSHEWLQPLTDALKVALDDATQPCWTYMDTYMR	
Hpv6a-el		
6b-el	PPDTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALDDATQPCWIYMDTYMR	
	541	600
Hpv11-el	NLLDGNPMSIDRKHRLTLIKCPPLLVTNSNIDISKEEKYKYLRSRVTTFTFPNPFPFDRN	
Hpv6a-el		
6b-el	NLLDGNPMSIDRKHKALTTLIKCPPLLVTNSNIDITKEEKYKYLHTRVTTFTFPNPFPFDRN	
	601	651
Hpv11-el	GNAVYELSDANWKCFERLSSLDIEDSEDEEDGSNSQAFRCVPGSVVRTL	
Hpv6a-el		
6b-el	GNAVYELSNANWKCFERLSSLDIQQSEDEEDGSNSQAFRCVPGBTVVRTL	
	GNAVYELSNTNWKCFFERLSSLDIQQSEDEEDGSNSQAFRCVPGBTVVRTL	

Fig. 2

6b-el	1	60
6b-el mut	MADDSTENEGSGCTGFMVEAIVQHPTGTQISDDEEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
6b-el	61	120
6b-el mut	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLKRYLGSPYVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
6b-el	121	180
6b-el mut	KVKRRLFQTRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDGQEKTGRDIEGEETAE	
6b-el	181	240
6b-el mut	APTN SVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDKTTCLDWVVA	
6b-el	241	300
6b-el mut	GFGIHHHSISEAFQKLIEPLSLYAHIQWLTNAWMVLLRLFKVNKSRSVTARTLATLLN	
6b-el	301	360
6b-el mut	IPENQMLIEPPKIQSGVAALYWFRIGSNASTVIGEAPEWITRQTVIEHGLADSQFKLTE	
6b-el	361	420
6b-el mut	MVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEMRK	
6b-el	421	480
6b-el mut	MSIKQWIKHRGSKIEGTGNWKPIVQFLRHQNIEFIPFLTKFLWLHGTPKKNCIAIVGPP	
6b-el	481	540
6b-el mut	DTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALDDATQPCWIYMDTYMRNL	
6b-el	541	600
6b-el mut	LDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVTSNIDITKEDKYKYLHTRVTTFTFPNPFFDRNGN	
6b-el	601	649
6b-el mut	AVYELSNTNWKCFFERLSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFRCVPGBTVVRTL	

Fig. 3

Hpv-11e2	1	60
	MEAIAKRLDACQDQLLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2	MEAIAKRLDACQEQLLELYEENSTDLNKHVLHWKCMRRESVLLYKAKQMGLSHIGMQVVP	
Hpv-11e2	61	120
	PLTVSETKGHNIAEMQMHLLESIAKTQYGVEPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFKKQGNTVEVK	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2	PLKVSEAKGHNIAEMQMHLLESLLKTEYSMEPWTLQETSYEMWQTPPKRCFKKRGKTVEVK	
Hpv-11e2	121	180
	FDGCEDNVMEYVVWTIYLQDNDSWVKVTSSVDAGIYYTCGQFKTYVNFNKEAEKYGS	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2	FDGCANNTMDYVVWTDVYVQDTSWVKVHSMVDAKGIYYTCGQFKTYVNFVKEAEKYGS	
Hpv-11e2	181	240
	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQTTPACTTEDGVSAPPRKR	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2	TKQWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIPESTTYTPAQTS. VSSSTQEDAVQTPPRKR	
Hpv-11e2	241	300
	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIPESTTYTPAQTS. VSSSTKEDAVQTPPRKR	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2	ARGPSTN..NTLCVANIRSVVDSTINNIVTDNYNKHQRNNNCNSATPIVQLQGDSNCLKC	
Hpv-11e2	301	360
	ARGVQQSPCNALCVAHGPVDSGNHNLITNNHDQHQRNNNSNSATPIVQFQGESNCLKC	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2	ARGVQQSPCNALCVAHGPVDSGNHNLITNNHDQHQRNNNSNSATPIVQFQGESNCLKC	
Hpv-11e2	361	369
	FRYRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLYTSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHK	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2	FRYRLNDKRRHLFDLISSTWHWASPKAPHKHAIVTVTYHSEEQRQQFLNVVKIPPTIRHK	
Hpv-11e2		
Hpv6a-e2	VGFMSLHLL	
Hpv6b-e2	LGFMSLHLL	

Fig. 4a

	1	60
Hpv-11e2-comut	MEAIAKRLDACQDQLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv-11e2-mut	MEAIAKRLDACQDQLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv-11e2-wt	MEAIAKRLDACQDQLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
	61	120
Hpv-11e2-comut	PLTVSETKGHNIAEMQMHL ESLAKTQYGV EPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFAKQGNTVEVK	
Hpv-11e2-mut	PLTVSETKGHNIAEMQMHL ESLAKTQYGV EPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFAKQGNTVEVK	
Hpv-11e2-wt	PLTVSETKGHNIAEMQMHL ESLAKTQYGV EPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFKQGNTVEVK	
	121	180
Hpv-11e2-comut	FDGCEDNVMEYVVWTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKG IYYTCGQFKTYYVN FNKEAQKYGS	
Hpv-11e2-mut	FDGCEDNVMEYVVWTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKG IYYTCGQFKTYYVN FNKEAQKYGS	
Hpv-11e2-wt	FDGCEDNVMEYVVWTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKG IYYTCGQFKTYYVN FNKEAQKYGS	
	181	240
Hpv-11e2-comut	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTREV SIAEPTTYTPAQT TAPTVSACTTEDGVSA PPRKR	
Hpv-11e2-mut	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTREV SIAEPTTYTPAQT TAPTVSACTTEDGVSA PPRKR	
Hpv-11e2-wt	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTREV SIAEPTTYTPAQT TAPTVSACTTEDGVSA PPRKR	
	241	300
Hpv-11e2-comut	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKC FR	
Hpv-11e2-mut	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKC FR	
Hpv-11e2-wt	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKC FR	
	301	360
Hpv-11e2-comut	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVT LTY SSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHKVG	
Hpv-11e2-mut	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVT LTY SSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHKVG	
Hpv-11e2-wt	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVT LTY SSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHKVG	
	361 367	
Hpv-11e2-comut	FMSLHLL	
Hpv-11e2-mut	FMSLHLL	
Hpv-11e2-wt	FMSLHLL	

Fig. 4b

	1	60
Hpv-6be2-wt	MEAIAKRLDACQEQL ELYEENSTD LH KHV LHWKCMRHE SVLLYKAKQMGLSHIGM QVVP	
Hpv-6be2-mut	MEAIAKRLDACQEQL ELYEENSTD LH KHV LHWKCMRHE SVLLYKAKQMGLSHIGM QVVP	
	61	120
Hpv-6be2-wt	PLKVSEAKGHNIAEMQMHL ESLIRTEYSMEPWTLQETSYEMWQT PPKRCFKRK GTVEVK	
Hpv-6be2-mut	PLKVSEAKGHNIAEMQMHL ESLIRTEYSMEPWTLQETSYEMWQT PPKRCFAKRGK TVEVK	
	121	180
Hpv-6be2-wt	FDGCANN TMDYVVWTDVYVQDN DTWVKVHS MVDAKG IYYTCGQFKTYYVN FVKEAEKYGS	
Hpv-6be2-mut	FDGCANN TMDYVVWTDVYVQDN DTWVKVHS MVDAKG IYYTCGQFKTYYVN FVKEAEKYGS	
	181	240
Hpv-6be2-wt	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTQEV SIPESTTYTPAQT STL.VSSSTKEDAVQT PPRKR	
Hpv-6be2-mut	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTQEV SIPESTTYTPAQT STL.VSSSTKEDAVQT PPRKR	
	241	300
Hpv-6be2-wt	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHNLITNNHDQHQRRNNNSSSATPIVQFQGESNCLKC	
Hpv-6be2-mut	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHNLITNNHDQHQRRNNNSSSATPIVQFQGESNCLKC	

Fig. 4 Cont..

	301		360
Hpv-6be2-wt	FRYRLNDRHRLFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEEQRQQFLDVVKIPPTISHK		
Hpv-6be2-mut	FRYRLNDRHRLFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEEQRQQFLDVVKIPPTISHK		
	361 369		
Hpv-6be2-wt	LGFMSLHLL		
Hpv-6be2-mut	LGFMSLHLL		

Fig. 5

1	60
HPV6bel-comut	GGGGCCGCCATGGCAGACGATTCCGGTACTGAGAACGAAGGTTCTGGTTGTACCGGTTGG
61	120
HPV6bel-comut	TTCATGGTTGAAGCAATCGTTCAGCATCCGACTGGTACCCAGATCTCCGATGACGAAGAC
121	180
HPV6bel-comut	GAAGAAGTTGAAGATTCTGGTTACGACATGGTGACTTCATCGATGACTCCAACATCACT
181	240
HPV6bel-comut	CATAACTCTCTGGAAGCACAGGCTCTGTTAACGCCAGGAAGCTGATAACCCATTACGCT
241	300
HPV6bel-comut	ACTGTTCAGGACCTGGGAGGCAAATATCTGGCTCTCCGTACGTTCCCCGATCAACACT
301	360
HPV6bel-comut	ATCGCAGAACCAAGTTGAGTCTGAAATCTCCCCGCGCTGGACGCTATCAAACGTGACTCGT
361	420
HPV6bel-comut	CAGCCGAAGAAGGTTAACGTCGTCTGTTCCAGACTCGTGAACTGACCGACTCCGGTTAC
421	480
HPV6bel-comut	GGTTATAGCGAAGTTGAGGCTGGCACCGGCACCCAGGTTGAAAAAACACGGTGTACCGGAA
481	540
HPV6bel-comut	AACGGCCGCGACGGTCAGGAAAAGGACACCGGCCGACATCGAGGGTGAGGAACACACC
541	600
HPV6bel-comut	GAAGCTGAAGCTCCACTAACTCTGTTCTGAAACACGCAGGTACTGCGGGTATCCTGGAA
601	660
HPV6bel-comut	CTGCTGAAATGCAAAGACCTGCGCGCGCTCTGCTGGCAAATTCAAAGAATGCTTCGGC
661	720
HPV6bel-comut	CTGTCTTCATTGACCTGATCCGTCCGTTAACGACTGACAAAACCTACCTGCTGGACTGG
721	780
HPV6bel-comut	GTTGTAAGCAGGCTTCGGCATCCACCACTCTATCTGAAGCATTCCAGAAAATGATCGAG
781	840
HPV6bel-comut	CCGCTGTCTCTGTACGCGCACATCCAGTGGCTGACTAACGCTGGGTATGGTCTGCTG
841	900
HPV6bel-comut	GTACTGCTGCGTTAAAGTAAACAAATCTGTTCCACTGTTGCTCGTACTCTGGCTACC
901	960
HPV6bel-comut	CTGCTGAACATCCCGAGAACCAAGATGCTGATCGAACCGCCGAAAATCCAGTCTGGCTGA
961	1020
HPV6bel-comut	GCTGCACTGTAATGGTTCTGACTGGCATCTCTAACGCTAGCACTGTTATCGGTGAAGCA
1021	1080
HPV6bel-comut	CCGGAATGGATCACTCGTCAGACCGTTATCGAACACGGCTGGCAGATTCTCAGTTCAA
1081	1140
HPV6bel-comut	CTGACTGAAATGGTTCACTGGGCATACGACAACGACATCTGCGAGGAATCTGAAATTGCG

Fig. 5 Cont..

HPV6bel-comut	1141	1200
	TTCGAATACTGCTCAGCGTGGCGACTTCGACTCCAACGCTCGTGCCTTCCTGAACAGCAAC	
HPV6bel-comut	1201	1260
	ATGCAGGCTAAATACGTAAAAGACTGCGCTACCATGTGCCGTCACTACAAACACGGCGAA	
HPV6bel-comut	1261	1320
	ATGCGTAAATGTCTATCAAACAGTGGATCAAGCACCGCGTTCTAAAATCGAAGGTACC	
HPV6bel-comut	1321	1380
	GTTAACTGGAAACCGATCGTTCAAGTGGATCAAGCACCGCGTTCTAAAATCGAATTCATCCGTT	
HPV6bel-comut	1381	1440
	CTGACCAAATTCAAGCTGTGGCTGCACGGTACCCC GAAAAAAACTGCATCGCTATCGTA	
HPV6bel-comut	1441	1500
	GGTCCACCGGACACTGACAAGTCTACTTCTGTATGTCCTGATCTCTTCCTGGCGGC	
HPV6bel-comut	1501	1560
	ACTGTAATCTCTCACGTTAACCTTCCTCCCATTCTGGCTGCAGCCACTGGTAGACGCG	
HPV6bel-comut	1561	1620
	AAAGTAGCTCTGCTGGACGACGCGACCCAGCCGTGGATCTACATGGATACATG	
HPV6bel-comut	1621	1680
	CGCAACCTGCTGGACGTAACCGATGTCTATCGACCGTAAACACAAAGCGCTGACTCTG	
HPV6bel-comut	1681	1740
	ATCAAGTGCCCCGCGCTGCTGGTAACCTCTAACATCGACATCACCAAGGAAGATAAAATAC	
HPV6bel-comut	1741	1800
	AAGTACCTGCATACCGTGTACTACCTTACTTCCC GAAACCGTTCCCGTTGATCGT	
HPV6bel-comut	1801	1860
	AACGGTAACGCTGTTACGAACTGTCCAACACTAACTGGAAATGCTCTCGAGCGTCTG	
HPV6bel-comut	1861	1920
	TCTTCCTCCCTGGACATCCAGGACTCTGAAGATGAAGAAGATGGTTCTAACTCTCAGGCT	
HPV6bel-comut	1921	1968
	TTCCGTTGTGTTCCGGTACTGTTGTTGTACTCTGTGAGGATCC''.	

Fig. 6

1 Hpvlle2-comut ' ' GCGGCCGCATGGAAGCCATCGCGAAGAGGCTCGACGCCCTGCCAGGACCAGCTGCTCG
 60
 61 Hpvlle2-comut AGCTGTACGAGGAGAACAGCATTGACATCCATAAGCACATCATGCACTGGAAGTGCATTC
 120
 121 Hpvlle2-comut GCCTGGAGAGCGTGCTGTTGCAAAAGGCCAACAGATGGCCCTGTCCCACATAGGCCCTTC
 180
 181 Hpvlle2-comut AGGTGGTCCCCCTCTGACCGTGTCAAGAGACAAGGGCCATAACGCAATCGAGATGCAGA
 240
 241 Hpvlle2-comut TGCACCTCGAGTCGCTGGCGAAAACACAGTACGGCGTGGAGCCATGGACCCCTGCAGGACA
 300
 301 Hpvlle2-comut CCTCGTACGAAATGTGGCTGACCCCACCTAACGCGATGCTCGCCAAACAGGGCAACACAG
 360
 361 Hpvlle2-comut TGGAGGTGAAGTTCGACGGCTGTGAGGATAACGTTATGGAGTATGTCGTGTGGACGCACA
 420
 421 Hpvlle2-comut TCTATCTGCAGGACAACGACAGTTGGGTGAAGGTGACCAGCTCCGTGGACGCGAAGGGCA
 480
 481 Hpvlle2-comut TCTACTATACCTGTGGCAGTTAAAACCTACTATGTAACTTCAACAAAGAGGCCAAA
 540
 541 Hpvlle2-comut AGTATGGCTCCACCAACCAACTGGGAGGTCTGCTATGGGAGCACGGTGATTTGCTCTCCCG
 600
 601 Hpvlle2-comut CCAGCGTGTCTAGCACTGTGCGCGAGGTGAGCATTGCCGAGCCGACCACGTACACCCCTG
 660
 661 Hpvlle2-comut CCCAGACGACCGCTCCGACCCTGTCTGCTTGTACTACCGAGGACGGCGTGAAGCGCTCCAC
 720
 721 Hpvlle2-comut CCAGGAAGCGTGCAGGGGCCAACGACCAACAACACCCCTCTGTTGGCGAACATTGCA
 780
 781 Hpvlle2-comut GCGTCGACAGTACCATCAATAACATCGTACGGATAACTATAACAGCACCAGAGCGTA
 840
 841 Hpvlle2-comut ACAACTGTCACTCTGCCGAACCCCCATCGTCAGCTCCAGGGAGACAGCAATTGCCCTTA
 900
 901 Hpvlle2-comut AGTGCTTCCGCTATGCCCTCAACGACAAGTACAAGCACCTCTTGAGCTCGCCTCGTCGA
 960
 961 Hpvlle2-comut CGTGGCACTGGGCCTCACCCGAGGCACCTCACAGAACGCCATCGTCACTCTCACTTACT
 1020
 1021 Hpvlle2-comut CCAGTGAGGAGCAGAGACAGCAGTTCTGAACAGCGTGAAGATCCCACCGACGATCCGTC
 1080
 1081 Hpvlle2-comut ATAAGGTGGCTTCATGTCAGTCATGCACTGCATCTCCTGTGAGGATCC
 1123

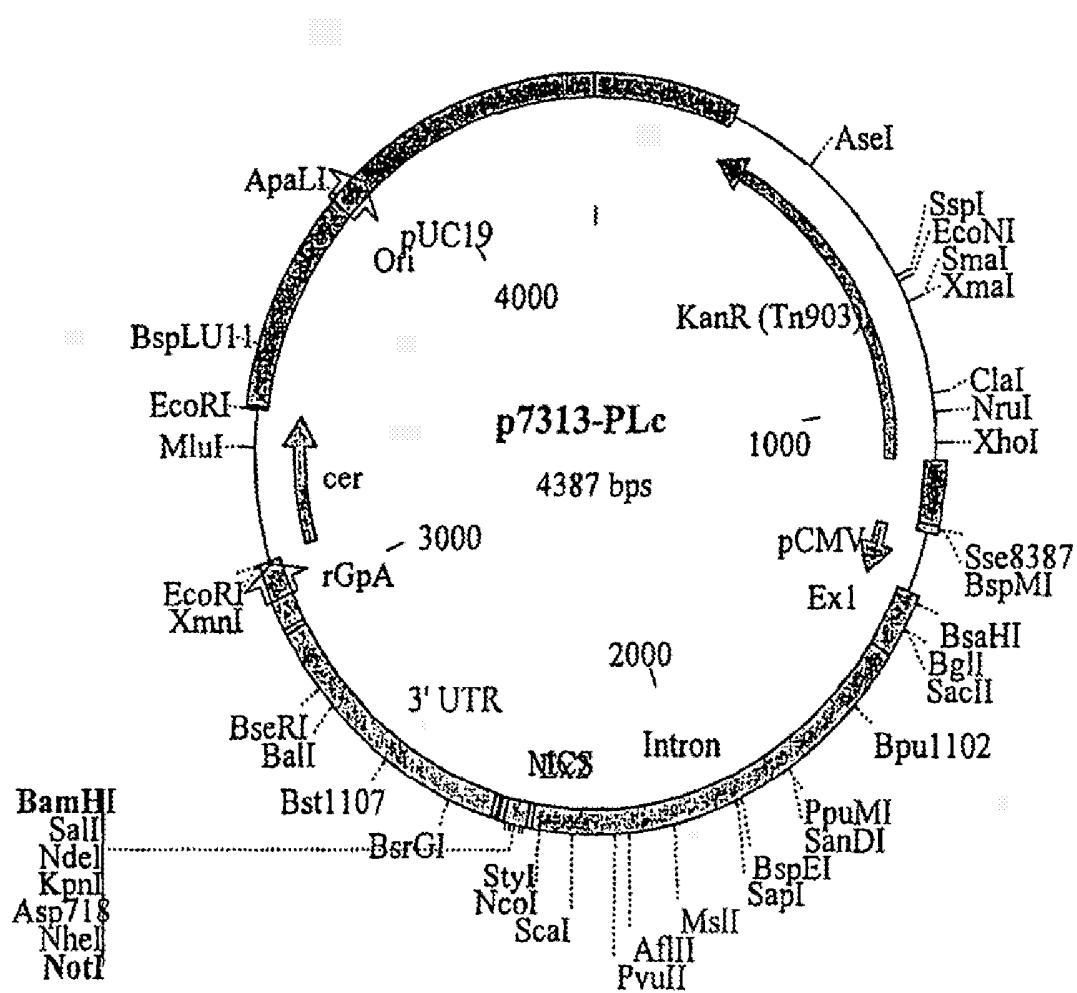
Figura 7: WRG7313plc

Fig. 8

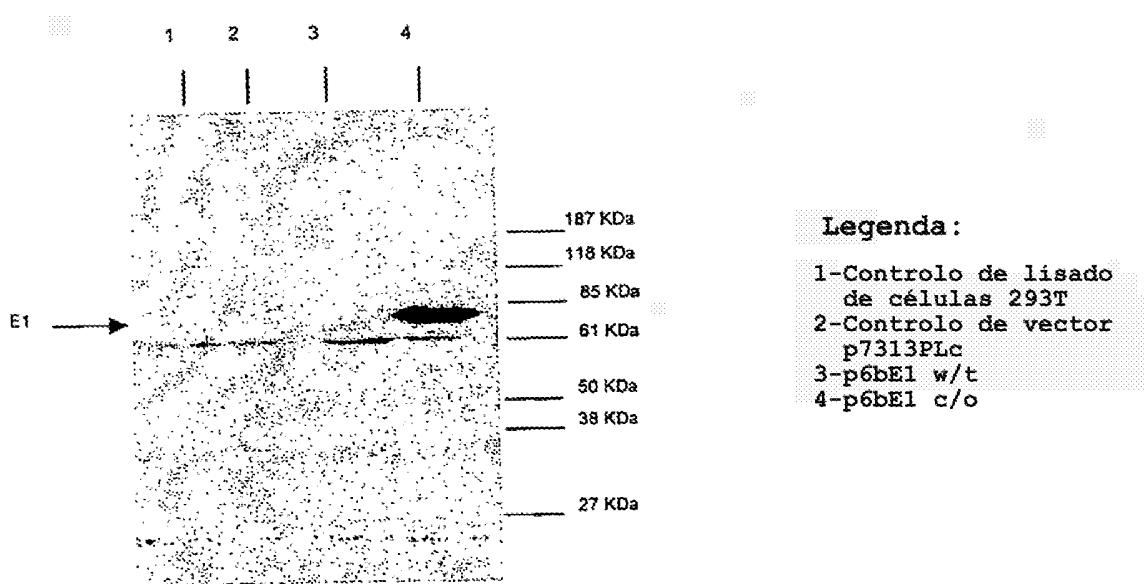


Fig. 9

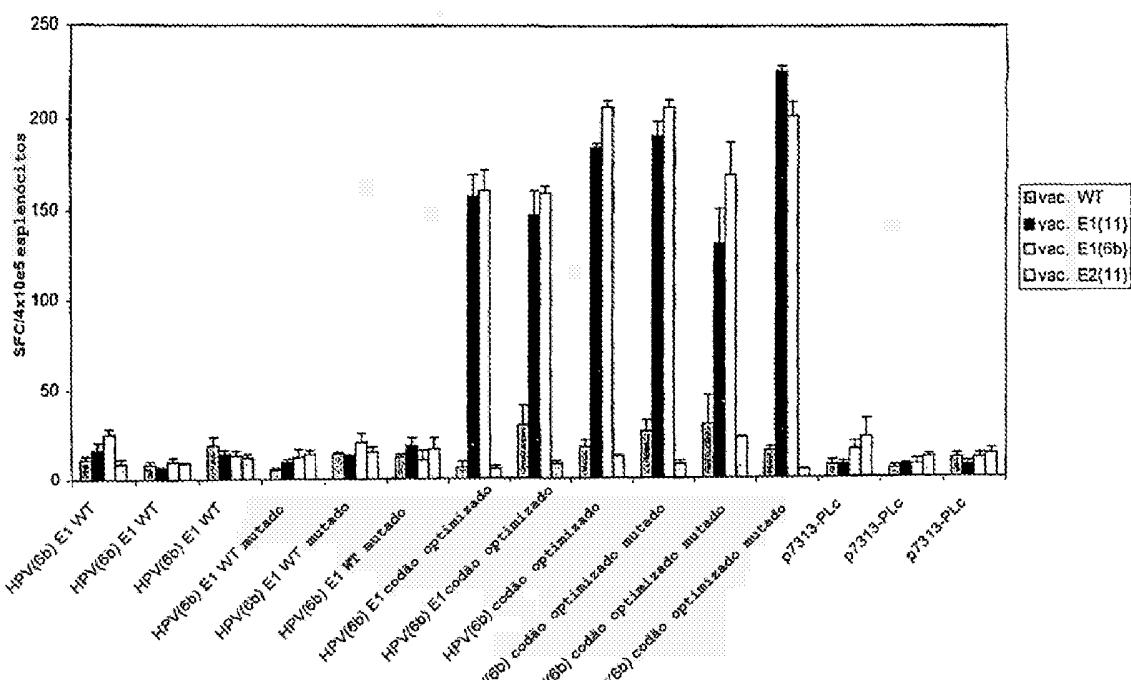
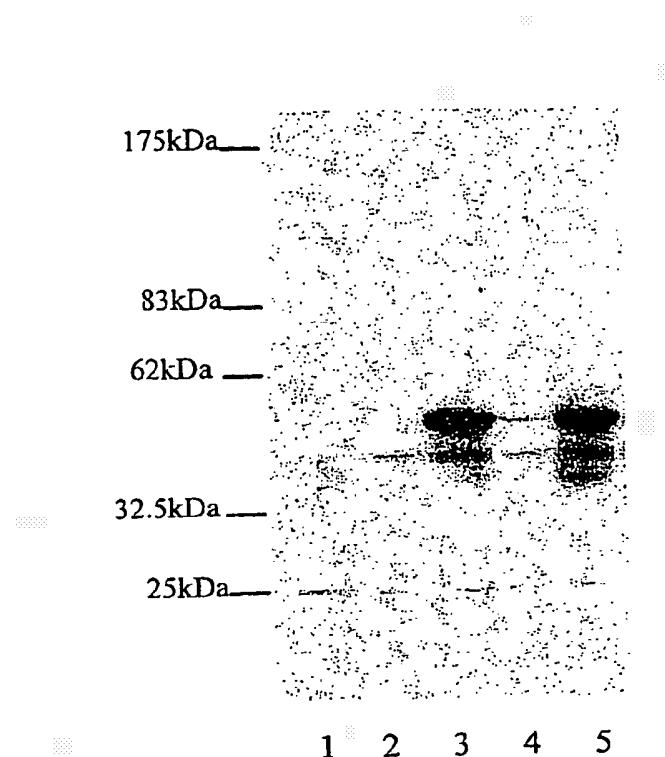


Fig. 10



- | | |
|---|------------------|
| 1 | p7313PLc |
| 2 | p6bE2 w/t |
| 3 | p6bE2 c/o |
| 4 | p6bE2 w/t mutado |
| 5 | p6bE2 c/o mutado |