



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 492**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06270010 .9**
96 Fecha de presentación : **06.10.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1690941**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **Formulaciones y formas de uso de la vacuna capsómero de virus de papiloma.**

30 Prioridad: **06.10.1997 US 944368**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2010

72 Inventor/es: **Gissmann, Lutz y**
Muller, Martin

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2010

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

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones y formas de uso de la vacuna capsómero de virus de papiloma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con formulaciones de vacunas que comprenden proteínas del virus del papiloma, como proteínas de fusión, proteínas truncadas, o proteínas de fusión truncadas. La invención adicionalmente abarca métodos para producir capsómeros de las formulaciones, como también métodos profilácticos y terapéuticos para su uso.

Antecedentes

Infecciones con ciertas cepas de alto riesgo de virus genital de papiloma en humanos (VPH) -por ejemplo. VPH 16, 18, o 45- se cree que son el principal factor de riesgo para la formación de tumores malignos del tracto anogenital. De las posibles malignidades, el carcinoma cervical es, con mucho, el más frecuente: de acuerdo a un estimado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), casi 500.000 nuevos casos de la enfermedad ocurren anualmente. Por la frecuencia con la cual ocurre esta patología, la conexión entre infección con VPH y carcinoma cervical ha sido extensivamente examinada, llevando a numerosas generalizaciones.

Por ejemplo, se conocen lesiones precursoras de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) por ser causadas por infecciones con el virus del papiloma [Crum, New Eng. J. Med. 310:880-883 (1984)]. ADN de los genomas de ciertos tipos de VPH, incluyendo por ejemplo, cepas 16, 18, 33, 35, y 45, han sido detectados en mas de 95% de las biopsias de tumor de pacientes con esta enfermedad, como también en líneas celulares primarias cultivadas de los tumores. Se ha encontrado que aproximadamente 50 a 70% de las células tumorales NIC incluyen ADN derivado solo de VPH 16.

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

A pesar de la capacidad de algunas cepas VPH para inducir fenotipos neoplásicos *in vivo* e *in vitro*, todavía otros tipos de VPH causan verrugas genitales benignas tales como *Condylomata acuminata* y son solo raramente asociados con tumores malignos [Ikenberg. In Gross, *et al.*, (eds.) GENITAL PAPILLOMAVIRUS INFECTIONS. Springer Verlag: Berlin, pp., 87-112]. Cepas de bajo riesgo de este tipo incluyen, por ejemplo, VPH 6 y 11.

Más a menudo, los virus del papiloma genital humano son transmitidos entre humanos durante el coito, lo cual en muchos casos, conlleva a la infección persistente en la membrana mucosa anogenital. Mientras esta observación sugiere que la infección primaria induce una respuesta inmune inadecuada o que el virus ha desarrollado la habilidad de evadir la vigilancia inmune, otras observaciones sugieren que el sistema inmune está activo durante la manifestación primaria como también durante la progresión maligna de infecciones del virus del papiloma [Altmann *et al.* en VIRUSES AND CANCER, Minson *et al.*, (eds.) Cambridge University Press, (1994) pp. 71-80].

Por ejemplo, la manifestación clínica de la infección primaria con virus de papiloma de conejo o bovino puede ser prevenida con vacunación con extractos de verrugas o proteínas estructurales virales [Altmann, *et al.*, *supra*; Campo, Curr. Top. En Microbiol and Immunol. 186:255-266 (1994); Yindle and Frazer, Curr. Top. En Microbiol. and Immunol. 186:217-253 (1994)]. Roedores previamente vacunados con recombinantes vaccinia que codifican proteínas tempranas VPH 16 E6 o E7, o con péptidos E6 o E7 sintéticos, son de la misma forma protegidos de la formación de tumores después de la inoculación de células transformadas autólogas VPH 16 [Altman, *et al.*, *supra*; Campo, *et al.*, *supra*; Yindle and Frazer, *et al. supra*]. La regresión de las verrugas puede ser inducida por la transferencia de linfocitos de animales regresores seguida de infección por virus de papiloma animal. Finalmente, en pacientes inmunosuprimidos, tales como, por ejemplo, receptores de trasplantes de órganos o individuos infectados con VIH, la incidencia de verrugas genitales, NIC, y cáncer anogenital es elevada.

DE4435907A y Virology 234, 1997, páginas 93-111 revela varios métodos para producir partículas tipo virus VPH. W09531476A revela el uso de un polipéptido sintético durante la preparación de una proteína de fusión L1 recombinante.

Hasta la fecha, no se han descrito vacunas de VPH que comprenden el virus del papiloma humano proteína L1 tardía en la forma de capsómeros que sean adecuados para propósitos profilácticos y terapéuticos. Ya que la proteína L1 no está presente en lesiones genitales malignas, la vacunación con la proteína L1 no tiene ningún potencial terapéutico para estos pacientes. La construcción de proteínas quiméricas, que comprende residuos de amino ácidos de la proteína

L1 y, por ejemplo proteína E6 o E7, lo que da lugar a capsómeros quiméricos, combina funciones profilácticas y terapéuticas de una vacuna. Un método para producción de alto nivel de capsómeros quiméricos sería por lo tanto particularmente deseable, en vista de las posibles ventajas ofrecidas por tal vacuna para intervención profiláctica y terapéutica.

Por lo tanto existe una necesidad en la técnica para proveer formulaciones de vacunas que puedan prevenir o tratar infección con VPH. Métodos para producir formulaciones de vacuna que superen los problemas conocidos en la técnica por ser asociados con la expresión y purificación de la proteína VPH recombinante sería manifiestamente útil para tratar la población de individuos ya infectados con VPH como también sería útil para inmunizar la población de individuos susceptibles a la infección con VPH.

Resumen de la invención

La presente invención provee formulaciones terapéuticas y profilácticas de la vacuna que comprenden capsómeros de papiloma humano quiméricos. La invención también provee métodos terapéuticos para tratar pacientes infectados con VPH como también métodos profilácticos para prevenir la infección por VPH en un individuo susceptible. Métodos para la producción y purificación de capsómeros y proteínas de la invención también son contemplados.

En un aspecto de la invención, se consideran las vacunaciones profilácticas para la prevención de la infección con VPH las cuales incorporan las proteínas estructurales L1 y L2 del virus del papiloma. El desarrollo de una vacuna de este tipo enfrenta obstáculos significativos porque los virus del papiloma no pueden ser propagados a titulaciones adecuadas en cultivos celulares u otros sistemas experimentales para proveer las proteínas virales en suficiente cantidad para una producción económica de la vacuna. Además, metodologías recombinantes para expresar las proteínas no son siempre sencillas y usualmente resultan en un bajo rendimiento de proteína. Recientemente han sido descritas partículas tipo-virus (VLPs), similares en conformación a estructuras cápsidas virales, las cuales son formadas en células Sf-9 de insecto en la expresión de proteínas virales L1 y L2 (o L1 por sí sola) usando vaccinia recombinante o baculovirus. La purificación de los VLPs puede ser lograda muy simplemente por medio de centrifugación en CsCl o gradientes de sacarosa [Kimbauer, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 99:12180-12814 (1992); Kirnbaurer, *et al.*, J. Virol. 67:6929-6936 (1994); Proso, *et al.*, J. Virol. 67:14:1936-1944 (1992); Sasagawa, *et al.*, Virology 2016:126-195 (1995); Volpers, *et al.*, J. Virol. 69: 3258-3264 (1995); Zhou, *et al.*, J. Gen. Virol. 74:762-769 (1993); Zhou, *et al.*, Virology 185:251-257 (1991)]. WO93/02184 describe un método en el cual partículas tipo virus de papiloma (VLPs) son usadas para aplicaciones diagnósticas o como una vacuna contra infecciones causadas por el virus del papiloma. WO 94/00152 describe la producción de proteína recombinante de L1 la cual imita el epítipo neutralizante conformacional en viriones de papiloma humanos y animales.

En otro aspecto de la invención, las vacunaciones terapéuticas son provistas para aliviar complicaciones de, por ejemplo, carcinoma cervical o lesiones precursoras resultando de infección con virus del papiloma, y por lo tanto representan una alternativa a la intervención profiláctica. Vacunaciones de este tipo pueden comprender proteínas tempranas de papiloma, principalmente E6 o E7, las cuales son expresadas en las células infectadas persistentemente. Se asume que, siguiendo la administración de una vacunación de este tipo, células-T citotóxicas pueden ser activadas contra células infectadas persistentemente en lesiones genitales. La aplicación PCT de patente WO 93/20844 revela que la proteína temprana E7 y fragmentos antigénicos de la misma del virus de papiloma de VPH o VPB son terapéuticamente efectivos en la regresión, pero no en la prevención, de tumores de virus de papiloma en mamíferos. Mientras que proteínas VPH tempranas han sido producidas por expresión recombinante en *E. coli* o tipos celulares eucarióticos apropiados, la purificación de las proteínas recombinantes se ha probado difícil debido a la baja solubilidad inherente y procedimientos de purificación complejos los cuales generalmente requieren una combinación de pasos, incluyendo cromatografía de intercambio de iones, filtración en gel y cromatografía de afinidad.

De acuerdo a la presente invención, formulaciones de vacunas que comprenden capsómeros de virus del papiloma están provistas las cuales comprenden (i) una primera proteína que es una proteína viral intacta expresada como una proteína de fusión comprendida en parte de residuos de amino ácidos de una segunda proteína; donde la segunda proteína es un antígeno tumoral humano, un antígeno viral o un antígeno bacteriano, dicha formulación provocando una respuesta inmune la cual neutraliza viriones del virus de papiloma humano donde dicho capsómero es obtenido por separación de o desensamblaje de partículas tipo virus. De acuerdo a la invención, formulaciones de la vacuna están provistas comprendiendo capsómeros de virus de papiloma bovino (VPB) y virus de papiloma humano. Capsómeros de virus de papiloma bovino preferidos comprenden proteínas de virus de papiloma bovino tipo 1. Capsómeros de virus de papiloma humano preferidos comprenden proteínas de cualquiera de las cepas de virus de papiloma humano VPH6, VPH11, VPH16, VPH18, VPH33, VPH35, y VPH45. Las formulaciones de la vacuna más preferidas comprenden capsómeros que comprenden proteínas de VPH16.

En un aspecto, formulaciones de vacuna capsómero de la invención comprenden una primera proteína viral intacta expresada como una proteína de fusión con residuos de amino ácido adicionales de una segunda proteína. Proteínas virales intactas preferidas son las proteínas estructurales virales de papiloma L1 y L2. Capsómeros compuestos de fusiones de proteína viral intacta pueden ser producidos usando las proteínas L1 y L2 juntas o la proteína L1 solamente. Capsómeros preferidos están hechos completamente de proteínas de fusión L1, la secuencia de amino ácido la cual es expuesta en SEQ ID NO: 2 y codificada por la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 1. Amino ácidos de la segunda proteína pueden ser derivados de numerosas fuentes (incluyendo residuos de amino ácido de la primera proteína) siempre y cuando la adición de los residuos de amino ácido de la segunda proteína a la primera proteína

5 permita la formación de capsómeros. Preferiblemente, la adición de los residuos de amino ácido de la segunda proteína inhibe la habilidad de la proteína viral intacta de formar estructuras de partícula tipo virus; más preferiblemente, los
 10 residuos de amino ácido de la segunda proteína promueven la formación de capsómeros. En una modalidad de la invención, la segunda proteína puede ser cualquier antígeno tumoral humano, antígeno viral, o antígeno bacteriano el cual es importante en la estimulación de una respuesta inmune en estados de enfermedades neoplásicas o infecciosas. En una modalidad preferida, la segunda proteína es también una proteína de virus de papiloma. También es preferido que la segunda proteína sea el producto de la expresión del gen temprano del virus de papiloma. También es preferido, sin embargo, que la segunda proteína sea seleccionada del grupo de E1, E2, E3, E4, E5, E6, y E7 - productos tempranos de genes codificados en el genoma de las cepas de virus de papiloma VPH6, VPH11, VPH18, VPH33, VPH35, o VPH
 15 45. Es más preferido que la segunda proteína sea codificada por el VPH16 gen E7, el marco de lectura abierto el cual es dispuesto en SEQ ID NO: 3. Capsómeros ensamblados de subunidades de proteína de fusión son referidos de aquí en adelante como capsómeros quiméricos. En una modalidad, la formulación de la vacuna de la invención es compuesta de capsómeros quiméricos donde residuos de amino ácidos de la proteína L1 forman aproximadamente 50 a 99% del total de residuos de amino ácidos de proteína de fusión. En otra modalidad, residuos de amino ácido L1 forman aproximadamente 60 a 90% del total de los residuos de amino ácido de la proteína de fusión; en una modalidad particularmente preferida, amino ácidos L1 comprenden aproximadamente 80% de los residuos de amino ácido de proteína de fusión.

20 En otro aspecto de la invención el cual es el tema de la aplicación de patente EP 98950930.2, formulaciones de vacuna de capsómero son provistas que son compuestas de proteínas virales truncadas teniendo una supresión de uno o más residuos de amino ácidos necesarios para la formación de una partícula tipo virus. Es preferido que la supresión de amino ácido no inhiba la formación de capsómeros por la proteína truncada, y es más preferido que la supresión favorezca la formación del capsómero. Formulaciones de vacunas preferidas de este tipo incluyen capsómeros compuestos de L1 truncada con o sin proteínas virales L2. Capsómeros particularmente preferidos están compuestos de
 25 proteínas truncadas L1. Proteínas truncadas contempladas por la invención incluyen aquellas que tienen uno o más residuos de amino ácidos borrados del terminal carboxi de la proteína, o uno o más residuos de amino ácidos borrados del terminal amino de la proteína, o uno o más residuos de amino ácido borrado de una región interna (es decir, no de cualquiera de los terminales) de la proteína. Formulaciones de la vacuna de capsómero preferidas están compuestas de proteínas truncadas en el terminal carboxi. En formulaciones que incluyen la proteína L1 derivada de VPH 16, es preferido que se borren desde 1 a 34 residuos de amino ácido carboxi terminal. Supresiones relativamente más cortas también son contempladas las cuales ofrecen la ventaja de menor modificación de las propiedades antigénicas de las proteínas L1 y los capsómeros formados del mismo. Es más preferido, sin embargo, que 34 residuos de amino ácidos sean borrados de la secuencia L1, correspondiendo a amino ácidos 472 a 505 en VPH16 expuesto en SEQ ID NO: 2, y codificado por la secuencia de polinucleótido correspondiente a los nucleótidos 1414 a 1516 en la secuencia de
 35 codificación L1 VPH16 expuesta en SEQ ID NO: 1.

40 Cuando una formulación de vacuna de capsómero es hecha de proteínas que portan una supresión interna, es preferido que la secuencia de amino ácido borrada comprenda la región de localización nuclear de la proteína. En la proteína L1 de VPH16, la señal de localización nuclear es encontrada desde aproximadamente el residuo de amino ácido 499 a aproximadamente el residuo de amino ácido 505. Siguiendo la expresión de las proteínas L1 donde el NLS ha sido borrado, el montaje de las estructuras de capsómero ocurre en el citoplasma de la célula huésped. Consiguientemente, la purificación de los capsómeros es posible desde el citoplasma en vez de desde el núcleo donde proteínas intactas L1 se ensamblan en capsómeros. Capsómeros que resultan del montaje de proteínas truncadas donde secuencias de amino ácido adicionales no reemplazan las secuencias de proteína borradas son necesariamente no quiméricas en naturaleza.

45 Formulaciones de vacuna de capsómero también son provistas lo cual es el tema de la aplicación de patente EP 98950930.2 comprendiendo proteína viral truncada expresada como una proteína de fusión adyacente a residuos de amino ácidos de una segunda proteína. Proteínas virales truncadas preferidas de la invención son las proteínas virales de papiloma estructural L1 y L2. Capsómeros compuestos de fusiones de proteína viral truncada pueden ser producidos usando componentes de proteína L1 y L2. Capsómeros compuestos de fusiones de proteína viral truncada pueden ser producidos usando componentes de proteínas L1 y L2 juntos o solo la proteína L1. Capsómeros preferidos son aquellos compuestos de residuos de amino ácido de proteína L1. Componentes de proteína viral truncada de las proteínas de fusión incluyen aquellas que tienen uno o más residuos de amino ácido borrados del terminal carboxi de la proteína, o uno o más residuos de amino ácido borrados del terminal amino de la proteína, o uno o más residuos de amino ácido borrados de una región interna (es decir, no de ninguno de los terminales) de la proteína. Formulaciones preferidas de la vacuna de capsómero están compuestas de proteínas truncadas en el terminal carboxi. En esas formulaciones incluyendo la proteína L1 derivada de VPH16, es preferido que desde 1 a 34 residuos de amino ácido carboxi terminal sean borrados. Supresiones relativamente más cortas también son contempladas que ofrecen la ventaja de menor modificación de las propiedades antigénicas del componente de la proteína L1 de la proteína de fusión y los capsómeros formados del mismo. Es más preferido, sin embargo, que 34 residuos de amino ácido sean borrados desde la secuencia L1, correspondiendo a los amino ácidos 472 a 505 en VPH16 presentado en SEQ ID NO: 2, y codificado por la secuencia de polinucleótido que corresponde a nucleótidos 1414 a 1516 en la secuencia de codificación de VPH16 humano L1 presentada en SEQ ID NO: 1. Cuando la formulación de la vacuna es compuesta de capsómeros formados por proteínas que portan una supresión interna, es preferido que la secuencia de amino ácido
 60 borrada comprenda la región de localización nuclear, o secuencia, de la proteína.

Amino ácidos de la segunda proteína pueden ser derivados de numerosas fuentes siempre y cuando la adición de los residuos de amino ácido de la segunda proteína a la primera proteína permita la formación de capsómeros.

Preferiblemente, la adición de los residuos de amino ácido de la segunda proteína promueve o favorece la formación de capsómeros. Residuos de amino ácido de la segunda proteína pueden ser derivados de numerosas fuentes, incluyendo residuos de amino ácido de la primera proteína. En una modalidad preferida, la segunda proteína es también una proteína del virus de papiloma. También es preferido que la segunda proteína sea el producto de expresión del gen temprano del virus del papiloma. Es más preferido, sin embargo, que la segunda proteína sea seleccionada del grupo de productos del gen temprano que codificando por genes E1, E2, E3, E4, E5, E6, y E7 del virus de papiloma. En una modalidad, la formulación de la vacuna de la invención es compuesta de capsómeros quiméricos donde los residuos de amino ácido de la proteína L1 forman aproximadamente 50 a 99% del total de los residuos de amino ácido de la proteína de fusión. En otra modalidad, residuos de amino ácido L1 forman aproximadamente 60 a 90% del total de residuos de amino ácido de proteína de fusión; en una modalidad particularmente preferida, amino ácidos L1 comprenden aproximadamente 80% de los residuos de amino ácido de proteína de fusión.

En una modalidad preferida de la invención, proteínas de las formulaciones de la vacuna son producidas por metodologías recombinantes, pero en formulaciones que comprenden proteína viral intacta, las proteínas pueden ser aisladas de las fuentes naturales. Proteínas intactas aisladas de fuentes naturales pueden ser modificadas *in vitro* para incluir residuos de amino ácido adicionales para proveer una proteína de fusión de la invención usando técnicas de modificación covalente bien conocidas y practicadas rutinariamente en la técnica. Similarmente, en formulaciones que comprenden proteínas virales truncadas, las proteínas pueden ser aisladas de fuentes naturales como proteínas intactas e hidrolizadas *in vitro* usando hidrólisis química o digestión enzimática con cualquiera de un número de proteasas sitio-específicas o generales, la proteína truncada subsecuentemente modificada para incluir residuos de amino ácido adicionales como descrito arriba para proveer una proteína de fusión truncada de la invención, la cual es el tema de la aplicación de patente EP 98950930.2.

En la producción de capsómeros, técnicas de biología molecular recombinante pueden ser utilizadas para producir ADN que codifique la proteína intacta deseada, la proteína truncada, o la proteína de fusión truncada. Metodologías recombinantes requeridas para producir un ADN que codifique una proteína deseada son bien conocidas y rutinariamente practicadas en la técnica. Manuales de laboratorio, por ejemplo Sambrook, *et al.*, (eds.). MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, NY (1989) y Ausubel *et al.*, (eds.). PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1997), describen en detalle técnicas necesarias para realizar las manipulaciones de ADN requeridas. Para la producción a gran escala de capsómeros quiméricos, la expresión proteica puede ser realizada usando vectores virales o eucarióticos. Vectores preferibles incluyen cualquiera de los vectores de expresión procarióticos bien conocidos, baculovirus recombinantes, vectores COS célula específicos, recombinantes de vaccinia, o construcciones de expresión levadura específicas. Cuando proteínas recombinantes son usadas para proveer capsómeros de la invención, las proteínas pueden ser primero aisladas de la célula huésped de su expresión y a partir de entonces incubadas bajo condiciones que permiten auto montaje para proveer capsómeros. Alternativamente, las proteínas pueden ser expresadas bajo condiciones donde los capsómeros son formados en la célula huésped.

La invención también contempla procesos para la producción de capsómeros de las formulaciones de la vacuna. En un método, las proteínas L1 son expresadas de ADN que codifica seis histidinas adicionales en el terminal carboxi de la secuencia codificadora de la proteína L1. Proteínas L1 expresadas con histidinas adicionales (proteínas His L1) son mas preferiblemente expresadas en *E. coli* y las proteínas His L1 pueden ser purificadas usando cromatografía de afinidad de níquel. Proteínas His L1 en lisado de célula son suspendidas en un amortiguador de desnaturalización, por ejemplo, 6M hidrocloreuro de guanidina o un amortiguador de capacidad desnaturalizante equivalente, y después sometido a cromatografía de níquel. Proteína eluida del paso de cromatografía de níquel es renaturalizada, por ejemplo en 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 0.01% Triton-X 100, 10 mM HEPES (-2 hidroxietil piperazina-N'-2 etano ácido sulfónico), pH 7.4. De acuerdo a un método preferido de la invención, el montaje de capsómeros toma lugar después de diálisis de las proteínas purificadas, preferiblemente después de diálisis contra 150 mM NaCl, 25 mM Ca²⁺, 10% DMSO (dimetil sulfóxido, 0.1% Triton-X 100, 10 mM Tris [tris-(hidroximetil) amino-metano] ácido acético con un pH de valor 5.0.

La formación de capsómeros puede ser monitoreada por microscopía electrónica, y, en casos donde los capsómeros están compuestos de proteínas de fusión, la presencia de varios componentes de proteína en el capsómero ensamblado puede ser confirmada por análisis de Western blot usando antisuero específico.

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

La administración de una formulación de vacuna puede incluir uno o más componentes adicionales tales como vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes, adyuvantes, y/o amortiguadores. Las vacunas pueden ser administradas una única vez o múltiples veces. La formulación de la vacuna de la invención puede ser administrada por varias vías incluyendo, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intramuscular, nasal, rectal, transdérmica, vaginal, subcutánea e intraperitoneal.

Formulaciones de la vacuna de la invención ofrecen numerosas ventajas cuando son comparadas a preparaciones convencionales de vacunas. Como parte de una vacunación terapéutica, los capsómeros pueden promover la eliminación de células persistentemente infectadas en, por ejemplo, pacientes con NIC o carcinoma cervical. Adicionalmente, vacunaciones terapéuticas de este tipo también pueden servir un propósito profiláctico protegiendo pacientes con lesiones NIC de una re-infección. Como una ventaja adicional, los capsómeros pueden escapar neutralización por anticuerpos anticápsidos pre existentes y por lo tanto poseen una vida media de circulación más larga comparado con partículas quiméricas tipo virus.

Formulaciones de vacunas que comprenden capsómeros quiméricos pueden proveer la ventaja adicional de antigenicidad aumentada de ambos componentes de proteína de la proteína de fusión de la cual se forma el capsómero. Por ejemplo, en un VLP, componentes de proteína del capsómero subyacente puede ser enterrada en la estructura global como un resultado de posicionamiento internalizado dentro del mismo VLP. Similarmente, epítopos de los componentes de proteína pueden ser obstruidos estéricamente como un resultado de contacto capsómero-a-capsómero, y por lo tanto inaccesible para provocar una respuesta inmune. Resultados preliminares usando proteínas de fusión L1/E7 para producir VLPs respaldan esta posición en la que ninguna respuesta de anticuerpos fue detectada contra el componente E7. Esta observación es consistente con previos resultados los cuales indican que la región terminal carboxi de L1 forma estructuras de brazo interpentaméricas que permiten el ensamblaje de capsómeros en cápsidos [Garcia, *et al.*, J. Virol. 71:2988-2995 (1997)]. Presumiblemente en una estructura quimérica de capsómero, ambos componentes de la proteína de la subestructura de la proteína de fusión son accesibles para provocar una respuesta inmune. Vacunas de capsómero podrían por lo tanto ofrecer la ventaja adicional de antigenicidad aumentada contra cualquier componente de proteína, incluyendo, por ejemplo, epítopos neutralizantes de proteínas de otros virus, expresadas como una fusión con secuencias de amino ácido L1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es ilustrada por los siguientes ejemplos. El Ejemplo 1 describe la construcción de vectores de expresión para producir proteínas de fusión, o quiméricas, o virales. El Ejemplo 2 se relaciona a la generación de baculovirus recombinantes para la expresión de proteínas virales. El Ejemplo 3 trata la purificación de capsómeros. El Ejemplo 4 describe un protocolo de inmunización para la producción de antisuero y anticuerpos monoclonales. El Ejemplo 5 provee un ELISA péptido para cuantificar la formación de capsómeros. El Ejemplo 6 describe un ELISA de captura de antígenos para cuantificar la formación de capsómeros. El Ejemplo 7 provee un ensayo de hemoaglutinina para ensayar para la inducción de anticuerpos neutralizantes.

Ejemplo 1

Construcción de Genes Quiméricos L1

El ADN que codifica el marco de lectura abierta VPH 16 L1 fue eliminado del plásmido 16-114/k-L1/L2-pSynxtVI- [Kirnbauer *et al.*, J. Virol. 67:6929-6936 (1994)] usando *Bgl*III y el fragmento resultante subclonado en pUC 19 (New England, Biolabs, Beverly, MA) previamente linealizado en el único sitio de restricción *Bam*HI. Dos construcciones de expresión básica fueron primero generadas para permitir inserción subsecuente de ADN para permitir expresión de la proteína de fusión. Una construcción codificada VPH 16 L1Δ310 teniendo una supresión de nueve amino ácidos: se conocía que la región borrada mostraba homología de bajo nivel con todas las otras proteínas L1 del virus de papiloma. La segunda construcción, VPH 16 L1 ΔC, codificaba una proteína con una supresión de 34 amino ácidos de los residuos del terminal carboxi L1. Otras construcciones incluyen un sitio de restricción *Eco*RV en la posición de la supresión para inserción facilitada de ADN que codifica otras secuencias de proteína. La adición del sitio *Eco*RV codifica dos amino ácidos de proteína no-L1, aspartato e isoleucina.

A. Generación de una construcción de expresión VPH 16 L1Δ310

Dos cebadores (SEQ ID NOs: 5 y 6) fueron diseñados para amplificar el vector pUC19 y la secuencia codificadora completa VPH 16 L1, excepto nucleótidos 916 hasta 942 en la SEQ ID NO: 1. Los cebadores fueron sintetizados para producir también un sitio de restricción único *Eco*RV (subrayado en las SEQ ID Nos: 5 y 6) en los terminales del producto de amplificación.

CCCCGATATCGCCTTTAATGTATAAATCGTCTGG

SEQ ID NO: 5

CCCCGATATCTCAAATTAT'ITTCCTACACCTAGTG

SEQ ID NO: 6

El producto PCR resultante fue digerido con *Eco*RV para proveer terminaciones complementarias y el producto de digestión circularizado por ligación. El ADN ligado fue transformado en *E. coli* usando técnicas estándar y plásmidos de colonias resultantes fueron exploradas para la presencia de un sitio de restricción *Eco*RV. Un clon designado VPH 16 L1 Δ310 fue identificado como teniendo la supresión apropiada de veintisiete nucleótidos y ésta construcción fue usada para insertar fragmentos de ADN que codifican otras proteínas VPH 16 en el sitio *Eco*RV como se discute abajo.

ES 2 337 492 T3

B. Generación de construcciones de expresión VPH 16 L1 ΔC

Dos cebadores (SEQ ID NOs: 7 y 8) fueron diseñados complementariamente para el marco de lectura abierta VPH 16 L1 tal que los cebadores colindaran uno con otro para permitir amplificación en direcciones contrarias sobre la plantilla de ADN que comprende las secuencias VPH 16 L1 en pUC19 descrito arriba.

AAAGATATCTTGTAGTAAAAATTTGCGTCCTAAAGGAAAC

SEQ ID NO: 7

AAAGATATCTAATCTACCTCTACAACTGCTAAACGCAAAAAACG

SEQ ID NO: 8

Cada cebador introdujo un sitio de restricción *EcoRV* en el terminal del producto de amplificación. En el cebador corriente abajo (SEQ ID NO: 8), el sitio *EcoRV* fue seguido por un codón de parada TAA translacional posicionado de forma que el producto de amplificación, en la ligación de los extremos de *EcoRV* para circularizar, incluiría la supresión de los 34 amino ácidos del terminal carboxi. Se realizó PCR para amplificar el marco parcial de lectura abierto L1 y el vector completo. El producto de amplificación fue roto con *EcoRV*, circularizado con ADN T4 ligasa, y transformado en células α DH5 *E. coli*. Plásmidos de clones viables fueron analizados para la presencia de un sitio *EcoRV* el cual linearizara el plásmido. Una construcción positiva designada pUCHPv16L1ΔC fue identificada y usada para insertar ADN de otras proteínas VPH 16 usando el sitio *EcoRV*.

C. Inserción de fragmentos de ADN en VPH 16 L1 Δ310 y VPH 16 L1 ΔC

Fragmentos de ADN de VPH 16 E7 que codifican amino ácidos 1-50, 1-60, 1-98, 25-75, 40-98, 50-98 en SEQ ID NO: 4 fueron amplificados usando cebadores que introducían sitios de restricción terminal 5' *EcoRV* para facilitar la inserción del fragmento en cualquiera de las secuencias modificadas VPH 16 L1 Δ310 y VPH 16 L1 ΔC. En varias de las reacciones de amplificación, el cebador E7.1 (SEQ ID NO: 9) fue usado en combinación con el cebador E7.2 (SEQ ID NO: 10) para generar un fragmento de ADN que codifica amino ácidos E7 1-50; con el cebador E7.3 (SEQ ID NO: 11) para generar un fragmento de ADN que codifica amino ácidos E7 1-60; o con el cebador E7.4 (SEQ ID NO: 12) para generar un fragmento de ADN que codifica amino ácidos E7 1-98. En otras reacciones de amplificación, pares de cebadores E7.5 (SEQ ID NO: 13) y E7.6 (SEQ ID NO: 14) fueron usados para amplificar un fragmento de ADN codificando amino ácidos E7 25-75; E7.7 (SEQ ID NO: 15) y E7.4 (SEQ ID NO: 12) fueron usados para amplificar un fragmento de ADN codificando amino ácidos E7 40-98; y E7.8 (SEQ ID NO: 16) y E7.4 (SEQ ID NO: 12) fueron usados para amplificar un fragmento de ADN codificando amino ácidos E7 50-98.

Cebador E7.1 SEQ ID NO: 9

AAAAGATATCATGCATGGAGATACACCTACATTGC

Cebador E7.2 SEQ ID NO: 10

TTTTGATATCGGCTCTGTCCGGTTCTGCTTGTCC

Cebador E7.3 SEQ ID NO: 11

TTTTGATATCCTTGCAACAAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCC

Cebador E7.4 SEQ ID NO: 12

AAAAGATATCTGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCAC

Cebador E7.5 SEQ ID NO: 13

TTTTGATATCGATTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAG

Cebador E7.6 SEQ ID NO: 14

TTTTGATATCGTCTACGTGTGTGCTTTGTACGCAC

Cebador E7.7 SEQ ID NO: 15

TTTATCGATATCGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGAC

Cebador E7.8 SEQ ID NO: 16

TTTTGATATCGATGCCATTACAATATTGTAACCTTTTG

Similarmente, nucleótidos del ADN que codifica la proteína matriz de influenza (SEQ ID NO: 17) fue amplificado usando el par de cebadores presentado en SEQ ID NOs: 19 y 20. Ambos cebadores introdujeron un sitio de restricción *EcoRV* en el producto de amplificación.

ES 2 337 492 T3

TTTTGATATCGATATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATC

SEQ ID NO: 19

TTTTGATATCGTTGTTTGGATCCCCATTCCCATTG

SEQ ID NO: 20

Productos PCR de cada una de las reacciones de amplificación fueron cortados con *EcoRV* e insertadas en el sitio *EcoRV* de cualquiera de las secuencias VPH 16 L1 Δ310 y VPH 16 L1 ΔC previamente linearizadas con la misma enzima. Para lograr determinar la orientación de las inserciones en plásmidos que codifican amino ácidos E7 25-75 y 50-98 y plásmido incluyendo proteína de matriz de influenza, se utilizó digestión *ClaI*, tomando ventaja de un sitio de restricción que esta superpuesto con el sitio de restricción recién creado *EcoRV* (GATATCGAT) e incluido en el cebador corriente arriba. Para las tres construcciones de expresión incluyendo la metionina de iniciación de VPH 16 E7, la orientación de la inserción fue determinada utilizando un sitio de restricción *NsiI* dentro de la región codificadora E7.

Una vez que las construcciones de expresión con inserciones apropiadas fueron identificadas, la región de codificación de la proteína para L1 y para amino ácidos insertados fue eliminado como una unidad usando enzimas de restricción *XbaI* y *SmaI* y el ADN aislado ligado al plásmido pVL 1393 (Invitrogen) para generar baculovirus recombinantes.

D. Eliminación de Sitios de Restricción *EcoRV* en Construcciones de Expresión

La secuencia VPH 16 L1 ΔC incluye ADN del sitio *EcoRV* que resulta en la translación de amino ácidos no encontrados normalmente en polipéptidos L1 tipo salvaje. Por lo tanto, una serie de construcciones de expresión fue diseñada en la cual el sitio *EcoRV* artificial fue eliminado. La secuencia L1 para éstas series de construcciones de expresión fue designado VPH 16L1ΔC*.

Para generar una construcción de expresión que contiene la secuencia VPH 16L1ΔC*, dos reacciones PCR fueron realizadas para amplificar dos fragmentos superpuestos de pUC-VPH16L1ΔC codificando amino ácidos E7 1-50. Los fragmentos de ADN resultantes fueron superpuestos en la posición del límite L1/E7 pero no contenía los dos sitios de restricción *EcoRV*. El fragmento 1 fue generado usando cebadores P1 (SEQ ID NO: 21) y P2 (SEQ ID NO: 22) y el fragmento 2 usando cebadores P3 (SEQ ID NO: 23) y P4 (SEQ ID NO: 24).

Cebador P1 SEQ ID NO: 21

GTTATGACATACATACATTCTATG

Cebador P2 SEQ ID NO: 22

CCATGCATTCCTGCTTGTAGTAAAAATTTGCGTCC

Cebador P3 SEQ ID NO: 23

CTACAAGCAGGAATGCATGGAGATACACC

Cebador P4 SEQ ID NO: 24

CATCTGAAGCTTAGTAATGGGCTCTGTCCGTTCTG

Después de las dos primeras reacciones de amplificación, los dos productos purificados fueron usados como plantillas en otra reacción PCR usando solamente los cebadores P1 y P4. El producto amplificado resultante fue digerido con enzimas *EcoNI* y *HindIII* insertado en la construcción de expresión VPH 16L1ΔC descrito arriba seguido de digestión con las mismas enzimas. La construcción de expresión resultante se diferenciaba de la construcción original VPH16LΔC con ADN codificando amino ácidos L1 y E7 1-50 por pérdida de los dos sitios de restricción internos *EcoRV*. El primer sitio *EcoRV* fue reemplazado por ADN codificando alanina nativa L1 y amino ácidos de glicina en esta posición y la segunda fue remplazada por una señal de parada translacional. En adición, la construcción de expresión, designada VPH 16 L1ΔC* E7 1-52, contenía los primeros 52 amino ácidos de VPH 16 E7 como resultado de usar el cebador P4 que también codifica residuos de amino ácidos E7 histidina en la posición 51 y tirosina en la posición 52. VPH 16 L1ΔC* E7 1-52 fue entonces usado para generar construcciones de expresión VPH 16 L1ΔC adicionales posteriormente incluyendo ADN que codifica amino ácidos E7 1-55 usando el cebador P1 (SEQ ID NO: 21) en combinación con el cebador P5 (SEQ ID NO: 25), amino ácidos E7 1-60 con el par de cebadores P1 y P6 (SEQ ID NO: 26), y amino ácidos E7 1-65 con el par de cebadores P1 y P7 (SEQ ID NO: 27). Las secuencias de ADN codificadoras de amino ácido adicionales en los productos de amplificación surgieron del diseño de los cebadores para incluir nucleótidos adicionales para los amino ácidos deseados.

ES 2 337 492 T3

Cebador P5 SEQ ID NO: 25

CATCTGAAGCTTAACAATATTGTAATGGGCTCTGTCCG

Cebador P6 SEQ ID NO: 26

CATCTGAAGCTTACTTGCAACAAAAGGTTA-

CAATATTGTAATGGGCTCTGTCCG

Cebador P7 SEQ ID NO: 27

CATCTGAAGCTTAAAGCGTAGAGTCACACTTGCAAC-

AAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCTCTGTCCG

Similarmente, VPH 16 L1ΔC* E7 1-70 fue generado usando la plantilla de ADN que codifica VPH 16 L1ΔC* E7 1-66 y el par de cebadores P1 y P8 (SEQ ID NO: 28).

Cebador P8 SEQ ID NO: 28

CATCTGAAGCTTATTGTACGCACAAC-

CGAAGCGTAGAGTCACACTTG

Siguiendo cada reacción PCR, los productos de amplificación fueron digeridos con *Eco*NI y *Hind*III e insertados en VPH16L1ΔC previamente digerido con las mismas enzimas. Secuencias de cada una de las construcciones fueron determinadas usando un instrumento de secuenciamiento Applied Biosystems Prism 377 con dideoxinucleótidos de terminación de cadena fluorescente [Prober *et al.*, Science 238:336-341 (1987)].

Ejemplo 2

Generación de Baculovirus Recombinante

Células *Spodoptera frugiperda* (Sf9) fueron cultivadas en cultivos de suspensión o monocapa a 27° en medio TNMFH (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal de becerro y 2 mM de glutamina. Para la construcción de baculovirus recombinante basado en VPH 16 L1, células Sf9 fueron transfectadas con 10 μg de plásmido de transferencia junto con 2 μg de ADN Baculo-Gold linearizado (PharMingen, San Diego, CA). Virus recombinante fueron purificados de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante.

Para probar la expresión de proteína VPH 16 L1, 10⁵ células Sf9 fueron infectadas con baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección (m.o.i) de 5 a 10. Después de incubación por tres a cuatro días a 28°C, se extrajo el medio y las células fueron lavadas con PBS. Las células fueron lisadas en amortiguador SDS de muestra y analizadas por SDS-PAGE y Western blotting usando anticuerpos anti-VPH16 L1 y anti-VPH16 E7.

Para poder determinar cuáles de las construcciones de expresión de proteína L1 quimérica producirían preferencialmente capsómeros, extractos de células transfectadas fueron sometidos a centrifugación de gradiente. Las fracciones obtenidas del gradiente fueron analizadas para el contenido de proteína L1 por Western blotting y para formación VLP por microscopía electrónica. Los resultados son mostrados en la Tabla 1.

La proteína VPH L1 intacta, como también la expresión de productos VPH 16 L1Δ310 y VPH 16 L1ΔC. Se mostró que cada uno producía capsómeros y partículas tipo virus en iguales proporciones. Cuando las secuencias de codificación E7 fueron insertadas en el vector VPH 16 L1 Δ310, sólo proteínas de fusión incluyendo amino ácidos E7 1 a 50 producidos dieron lugar a formación detectable de capsómeros.

Cuando el ADN que codifica E7 fue insertado en el vector VPH 16 L1ΔC, se encontró que todas las proteínas de fusión producen capsómeros; proteínas quiméricas incluyendo residuos de amino ácido E7 40-98 produjeron el nivel más alto de estructuras exclusivamente de capsómero. Proteínas quiméricas incluyendo amino ácidos E7 1-98 y 25-75 ambos produjeron predominantemente capsómeros, aunque también se observó formación de partículas tipo virus. La proteína quimérica incluyendo amino ácidos 1-60 resultó en niveles casi iguales de producción de capsómeros y partículas tipo virus.

Cuando secuencias E7 fueron insertadas en el vector VPH 16 L1ΔC*, se mostró que todas las proteínas de fusión producían capsómeros. La inserción de ADN que codifica para residuos E7 1-52, 1-55, y 1-60 produjeron el nivel más alto de capsómeros, pero se observaron niveles iguales de producción de partículas tipo virus. Mientras la inserción de ADN que codifique ADN E7 para residuos 1-65, 1-70, 25-75, 40-98, y 1-98 resultó en niveles de cápsido comparativamente más bajos o indetectables, capsómeros fueron producidos en altas cantidades.

ES 2 337 492 T3

TABLA 1

Capacidad de Formacion de Capsómero y Capsido de Proteínas Quiméricas VPH L1

Construcción de Expresión L1	Inserción	Rendimiento de Capsómero	Rendimiento de Cápsido
VPH 16 L1	Ninguno	+++++	+++++
VPH 16 L1Δ310	Ninguno	+++	++
VPH 16 L1ΔC	Ninguno	++++	++++
VPH 16 L1Δ310	E7 1-98	-	-
VPH 16 L1Δ310	E7 1-50	++	-
VPH 16 L1Δ310	E7 25-75	-	-
VPH 16 L1Δ310	E7 50-98	-	-
VPH 16 L1ΔC	E7 1-98	+++	+
VPH 16 L1ΔC	E7 25-75	+++	+
VPH 16 L1ΔC	E7 50-98	+	+
VPH 16 L1ΔC	E7 1-60	+++++	+++++
VPH 16 L1ΔC	E7 40-98	++++	-
VPH 16 L1ΔC	Influenza	+++	+
VPH 16 L1Δ*C	E7 1-52	+++++	+++++
VPH 16 L1Δ*C	E7 1-55	+++++	+++++
VPH 16 L1Δ*C	E7 1-60	+++	++++
VPH 16 L1Δ*C	E7 1-65	++	-
VPH 16 L1Δ*C	E7 1-70	++	-

Ejemplo 3

Purificación de Capsómeros

Células Trichopulsia ni (TN) High Five fueron cultivadas a una densidad de aproximadamente 2×10^6 células/ml en medio libre de suero Ex-Cell 405 (JRH Biosciences). Aproximadamente 2×10^8 células fueron peletizadas por centrifugación a $1000 \times g$ por 15 minutos, resuspendido en 20 ml de medio, e infectado con baculovirus recombinante a m.o.i de 2 a 5 por 1 hora a temperatura ambiente. Después de la adición de 200 ml de medio, las células fueron sembradas sobre placa e incubadas por 3 a 4 días a 27°C. Seguido de la incubación, las células fueron recolectadas, peletizadas, y resuspendidas en 10 ml de amortiguador de extracción.

Los siguientes pasos fueron realizados a 4°C. Las células fueron sonicadas por 45 segundos a 60 vatios y el lisado de células resultante fue centrifugado a 10.000 rpm en un rotor Sorval SS34. El sobrenadante fue removido y retenido mientras que el peletizado fue resuspendido en 6 ml de amortiguador de extracción, sonicado por 3 segundos adicionales a 60 vatios, y nuevamente centrifugado. Los dos sobrenadantes fueron combinados, puestos en capas sobre un gradiente de dos pasos que contiene 14 ml de 40% sacarosa sobre 8 ml de solución CsCl (4.6 g CsCl por 8 ml en amortiguador de extracción), y centrifugado en un rotor Sorval AH629 de contenedor oscilante por 2 horas a 27,000 rpm a 10°C. La región de interfase entre la CsCl y la sacarosa junto con la capa completa CsCl fueron recolectados en tubos Quickseal de 13.4 ml (Beckman) y se agregó amortiguador de extracción para ajustar el volumen a 13.4 ml. Se centrifugaron las muestras toda la noche a 50.000 rpm a 20°C en un rotor Beckman 70 TI. Los gradientes fueron fraccionados (1 ml por fracción) perforando tubos arriba y en el fondo con una aguja de calibre 21. Las fracciones de cada tubo fueron recolectadas y 2.5 µl de cada fracción fueron analizados por un 10% gel SDS-poliacrilamida y Western blotting usando un anticuerpo anti-VPH16 L1.

Partículas tipo virus y capsómeros fueron separados de las fracciones identificadas arriba por sedimentación en 10 a 50% gradientes de sacarosa. Fracciones pico de gradientes CsCl fueron reunidas y dializadas por 2 horas contra 5 mM HEPES (pH 7.5). La mitad del dializado fue usado para producir capsómero por desensamblaje de VLPs intactos durante la noche agregando EDTA (concentración final 50 mM), EGTA (50 mM), DTT (30 mM). NaCl (100 mM), y Tris/HCl, pH 8.0, (10 mM). Como control, solo se agregó NaCl y Tris/HCl a la otra mitad.

ES 2 337 492 T3

Para el análisis de capsómeros producidos de VLPs desensamblados, EDTA, EGTA, y DTT (concentración final 5 mM cada uno) fueron agregados a los protectores de sacarosa los cuales fueron centrifugados a 250,000 x g por 2 a 4 horas a 4°C. Las fracciones fueron recolectadas perforando tubos desde el fondo. Una dilución de 1:10 de cada fracción fue entonces analizada por captura de antígeno ELISA.

Ejemplo 4

Protocolo de Inmunización para la Producción de Antisuero Policlonal y Anticuerpos Monoclonales

Ratones calvos/c son inmunizados subcutáneamente tres veces, cada cuatro semanas con aproximadamente 60 µg de capsómeros quiméricos de VPH mezclados 1:1 con Adyuvante de Freund completo o incompleto en un volumen total de 100 µg. Seis semanas después de la tercera inmunización, los ratones son sacrificados y se recolecta sangre por punción cardíaca.

Ejemplo 5

ELISA Péptido para Cuantificar la Formación de Capsómeros

Placas de microtítulo (Dynatech) son cubiertas toda la noche con 50 µl de péptido E701 [Muller *et al.*, 1982] a una concentración de 10 µg/ml en PBS. Los pozos son cubiertos por 2 horas a 37°C con 100 µl de amortiguador que contiene 5% de BSA y 0.05% Tween 20 en PBS y lavados tres veces con PBS que contiene 0.05% Tween 20. Después de la tercera lavada, 50 µl de suero diluido 1:5000 en BSA/Tween 20/PBS es agregado a cada pozo y se incuba por 1 hora. Se lavan las placas nuevamente como antes y 50 µl de conjugado de peroxidasa de cabra-anti-ratón es agregado a una dilución de 1:5000. Después de 1 hora, se lavan las placas y se manchan usando sustrato ABTS (0.2 mg/ml, 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenziazolina-β-sulfónico en 0.1 M amortiguador Na-Acetato-Fosfato (pH 4.2) con 4 µl 30% H₂O₂ por 10 ml). La extinción es medida después de 1 hora a 490 nm en un lector de placa automático Dynatech.

Ejemplo 6

Captura de Antígeno ELISA para Cuantificar la Formación de Capsómero

Para permitir cuantificación relativa de partículas tipo virus y capsómeros en fracciones de gradientes CsCl, se utilizó una captura de antígeno ELISA. Placas de microtítulo fueron cubiertas toda la noche con 50 µl/pozo de una dilución de 1:500 (concentración final de 2 µg por ml, en PBS) con una proteína A anticuerpo monoclonal de ratón purificado de proteína A inmuno específico para VPH 16 L1 (anticuerpos 25/C, MM07 y Ritti 1 fueron obtenidos de ratones inmunizados con VPH 16 VLPs). Se bloquearon placas con 5% leche/PBS por 1 hora y 50 µl de fracciones de gradientes CsCl fueron agregados por 1 hora a 37°C usando una dilución de 1:300 (en 5% leche/PBS). Después de tres lavadas con PBS/0.05% Tween 20, 50 µl de un antisuero de conejo policlonal (dilución 1:3000 en leche/PBS), cultivado contra VPH 16 VLPs fue agregado y se incubaron placas a 37° por 1 hora. Las placas fueron lavadas nuevamente y posteriormente incubadas con 50 µl de conjugado de peroxidasa de cabra-anti-conejo (Sigma) diluido 1:5000 en PBS conteniendo 5% de leche por 1 hora. Después del lavado final, las placas fueron teñidas con sustrato ABTS por 30 minutos y la extinción fue medida a 490 nm en un lector de placa automático Dynatech. Como control negativo, el ensayo también incluyó pozos cubiertos solamente con PBS.

Para probar anticuerpos monoclonales para especificidad de capsómero, los VLPs con EDTA/DTT para desensamblar partículas. Preparaciones de partícula tratadas fueron ensayadas en un ELISA antígeno-captura y las lecturas fueron comparadas a controles no tratados. Para el desensamblaje, 40 µl de VLPs fueron incubados toda la noche a 4°C en 500 µl de amortiguador de disrupción conteniendo 30 mM DTT. 50 mM usados en el ELISA de captura de arriba en una dilución 1:20-1:40.

Ejemplo 7

Ensayo de Inhibición de Hemaglutinina

Para poder determinar la extensión a la cual vacunas de capsómero quiméricas provocan producción de anticuerpos neutralizantes, se realiza un ensayo de inhibición de hemaglutinación como se describe brevemente abajo. Este ensayo es basado en previas observaciones que partículas tipo virus son capaces de hemoaglutinar células rojas sanguíneas.

Los ratones son inmunizados con cualquiera de las vacunas de capsómero quiméricas y suero es recolectado como descrito arriba en el Ejemplo 4. Como controles positivos, partículas tipo virus VPH16 L1 (VLPs) PV1 bovino (VPB) L1 VLPs son ensayados en paralelo con una preparación de capsómero quimérico. Para establecer una línea base positiva, el VPH16 o VPB1 VLPs son primero incubados con o sin suero recolectado de ratones inmunizados después de lo cual se agregan células sanguíneas rojas. La extensión a la cual la preincubación con suero de ratón inhibe la hemoaglutinación de células rojas sanguíneas es una indicación de la capacidad de neutralización de suero de ratón. Los experimentos son entonces repetidos usando capsómeros quiméricos para poder determinar el efecto neutralizante del suero de ratón en la vacuna. Un protocolo breve para el ensayo de inhibición de hemoaglutinación es descrito abajo.

ES 2 337 492 T3

Cien microlitros de heparina (1000 usp unidades/ml) son agregadas a 1 ml de sangre de ratón fresca. Células sanguíneas rojas son lavadas tres veces con PBS seguido de centrifugación y resuspensión en un volumen de 10 ml. Después, los eritrocitos son resuspendidos en 0.5 ml de PBS y almacenados a 4°C por hasta tres días. Para el ensayo de hemoaglutinina 70 μ l de la suspensión son usados por pozo en una placa de 96 pozos.

Alicuotas de capsómero quimérico de gradientes CsCl son dializados por una hora contra 10 mM Hepes (pH7.5) y 100 μ l de diluciones dobles en serie en PBS son agregadas a eritrocitos de ratón en placas de microtítulo de 96 pozos de fondo redondo las cuales son posteriormente incubadas por 3-16 horas a 4°C. Para la inhibición de hemoaglutinación, los capsómeros son incubados con diluciones de anticuerpos en PBS por 60 minutos a temperatura ambiente y después son agregadas a los eritrocitos. El nivel de hemoaglutinación de eritrocitos, y por lo tanto la presencia de anticuerpos neutralizantes, es determinada por métodos estándar.

En resultados preliminares, suero de ratón generado contra capsómeros quiméricos comprendiendo proteína VPH16L1 Δ C en asociación con residuos de amino ácido E7 1-98 se observó que inhibe la hemoaglutinación por VPH16 VLPs, pero no por VPB VLPs. El suero de ratón fue por lo tanto positivo para la neutralización de anticuerpos contra los VLPs humanos y ésta neutralización diferencial fue más probablemente el resultado de especificidad de anticuerpos por epítomos contra los cuales los anticuerpos fueron cultivados.

Numerosas modificaciones y variaciones en la invención son expuestas en los ejemplos ilustrativos de arriba y se espera que le ocurran a aquellos diestros en la técnica. Consiguientemente solo tales limitaciones como aparecen en las reivindicaciones anexas deben ser ubicadas en la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación antigénica que comprende un capsómero de virus de papiloma humano para usar como una vacuna, estando dicho capsómero compuesto de una proteína de fusión compuesta de proteína L1 de virus de papiloma humano, residuos de amino ácido adyacentes de una segunda proteína, donde la segunda proteína es un antígeno de tumor humano, un antígeno viral o antígeno bacterial, provocando dicha formulación una respuesta inmune la cual neutraliza los viriones del virus de papiloma humano donde dicho capsómero es obtenido por separación de partículas tipo virus.

2. Una formulación antigénica que comprende un capsómero de virus de papiloma humano para ser usado como una vacuna, estando dicho capsómero compuesto de una proteína de fusión compuesta de proteína L1 de virus de papiloma humano, residuos de amino ácido adyacentes de una segunda proteína, donde la segunda proteína es un antígeno de tumor humano, un antígeno viral o antígeno bacterial, provocando dicha formulación una respuesta inmune la cual neutraliza los viriones del virus de papiloma humano donde dicho capsómero es obtenido por el desensamblaje de partículas tipo virus.

3. La formulación antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde la proteína L1 es codificada en el genoma de un virus de papiloma humano seleccionado del grupo que consiste de VPH6, VPH11, VPH16, VPH18, VPH33, VPH35, y VPH45.

4. La formulación antigénica de acuerdo con la reivindicación 3 donde el virus de papiloma es VPH16.

5. La formulación antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde los residuos de amino ácido de la segunda proteína son derivados de una proteína VPH.

6. La formulación antigénica de acuerdo con la reivindicación 5 donde la proteína VPH es una proteína VPH temprana.

7. La formulación antigénica de acuerdo con la reivindicación 6 donde la proteína VPH temprana es seleccionada de un grupo que consiste de E1, E2, E3, E4, E5, E6, y E7.

8. El uso de la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de infección con VPH y enfermedades relacionadas a éste.

9. El uso de la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la producción de una composición farmacéutica para la prevención de infección con VPH y enfermedades relacionadas a éste.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) APLICANTE:
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Formulaciones de Vacuna de Capsómero de Virus de Papiloma y Métodos de Uso
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 27
- (iv) DIRECCION DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray & Borun
- 15 (B) CALLE: 233 South Wacker Drive, 6300 Sears Tower
- (C) CIUDAD: Chicago
- (D) ESTADO: Illinois
- (E) PAIS: Estados Unidos de América
- 20 (F) APARTADO POSTAL: 60606-6402
- (v) FORMULARIO LEÍBLE POR COMPUTADORA:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco floppy
- 25 (B) COMPUTADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatetIn Release #1.0, Versión #1.30
- 30 (vi) DATOS DE APLICACIÓN ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE APLICACIÓN:
- (B) FECHA DE ARCHIVO:
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Williams Jr., Joseph A.
- 40 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 38,659
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 27013/34028
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: 312-474-6300
- (B) TELEFAX: 312-474-0448

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1518 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 55 (C) CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 60 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..1518
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:
- 65

ES 2 337 492 T3

	ATG TCT CTT TGG CTG CCT AGT GAG GCC ACT GTC TAC TTG CCT CCT GTC	48
	Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val	
	1 5 10 15	
5	CCA GTA TCT AAG GTT GTA AGC ACG GAT GAA TAT GTT GCA CGC ACA AAC	96
	Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn	
	20 25 30	
	ATA TAT TAT CAT GCA GGA ACA TCC AGA CTA CTT GCA GTT GGA CAT CCC	144
	Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro	
	35 40 45	
10	TAT TTT CCT ATT AAA AAA CCT AAC AAT AAC AAA ATA TTA GTT CCT AAA	192
	Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys	
	50 55 60	
15	GTA TCA GGA TTA CAA TAC AGG GTA TTT AGA ATA CAT TTA CCT GAC CCC	240
	Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro	
	65 70 75 80	
	AAT AAG TTT GGT TTT CCT GAC ACC TCA TTT TAT AAT CCA GAT ACA CAG	288
	Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln	
	85 90 95	
20	CGG CTG GTT TGG GCC TGT GTA GGT GTT GAG GTA GGT CGT GGT CAG CCA	336
	Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro	
	100 105 110	
25	TTA GGT GTG GGC ATT AGT GGC CAT CCT TTA TTA AAT AAA TTG GAT GAC	384
	Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp	
	115 120 125	
	ACA GAA AAT GCT AGT GCT TAT GCA GCA AAT GCA GGT GTG GAT AAT AGA	432
	Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg	
	130 135 140	
30	GAA TGT ATA TCT ATG GAT TAC AAA CAA ACA CAA TTG TGT TTA ATT GGT	480
	Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly	
	145 150 155 160	
35	TGC AAA CCA CCT ATA GGG GAA CAC TGG GGC AAA GGA TCC CCA TGT ACC	528
	Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr	
	165 170 175	
	AAT GTT GCA GTA AAT CCA GGT GAT TGT CCA CCA TTA GAG TTA ATA AAC	576
	Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn	
	180 185 190	
40	ACA GTT ATT CAG GAT GGT GAT ATG GTT GAT ACT GGC TTT GGT GCT ATG	624
	Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met	
	195 200 205	
45	GAC TTT ACT ACA TTA CAG GCT AAC AAA AGT GAA GTT CCA CTG GAT ATT	672
	Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile	
	210 215 220	
50	TGT ACA TCT ATT TGC AAA TAT CCA GAT TAT ATT AAA ATG GTG TCA GAA	720
	Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu	
	225 230 235 240	
	CCA TAT GGC GAC AGC TTA TTT TTT TAT TTA CGA AGG GAA CAA ATG TTT	768
	Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe	
	245 250 255	
55	GTT AGA CAT TTA TTT AAT AGG GCT GGT GCT GTT GGT GAA AAT GTA CCA	816
	Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro	
	260 265 270	
60	GAC GAT TTA TAC ATT AAA GGC TCT GGG TCT ACT GCA AAT TTA GCC AGT	864
	Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser	
	275 280 285	
65		

ES 2 337 492 T3

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

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(iii) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55

(A) LONGITUD: 506 amino ácidos

(B) TIPO: amino ácido

(C) TOPOLOGÍA: linear

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

65

ES 2 337 492 T3

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

ES 2 337 492 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 297 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 45 (C) CADENAS: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: linear
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 50 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 1..297
 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

60 ATG CAT GGA GAT ACA CCT ACA TTG CAT GAA TAT ATG TTA GAT TTG CAA 48
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC TGT TAT GAG CAA TTA AAT GAC AGC TCA 96
 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30

ES 2 337 492 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 98 amino ácidos

(B) TIPO: amino ácido

25 (D) TOPOLOGÍA: linear

(iii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

60 (C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

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

CCCCGATATC GCCTTTAATG TATAAATCGT CTGG

ES 2 337 492 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

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

CCCCGATATC TCAAATTATT TTCCTACACC TAGTG

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

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

AAAGATATCT TGTAATAAAA ATTTGCGTCC TAAAGGAAAC

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

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

AAAGATATCT AATCTACCTC TACAACTGCT AAACGCAAAA AACG

44

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

AAAAGATATC ATGCATGGAG ATACACCTAC ATTGC

35

ES 2 337 492 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

TTTTGATATC GGCTCTGTCC GGTCTGCTT GTCC

34

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

TTTTGATATC CTTGCAACAA AAGGTTACAA TATTGTAATG GGCC

44

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

AAAAGATATC TGGTTTCTGA GAACAGATGG GGCAC

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

TTTTGATATC GATTATGAGC AATTAAATGA CAGCTCAG

38

ES 2 337 492 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de base

(E) TIPO: ácido nucleico

(F) CADENAS: sencilla

(G) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

TTTTGATATC GTCTACGTGT GTGCTTTGTA CGCAC

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

(iii) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

TTTATCGATA TCGGTCCAGC TGGACAAGCA GAACCGGAC

39

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

(iii) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

TTTTGATATC GATGCCCATTT ACAATATTGT AACCTTTTG

39

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 294 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACION: 1..294

ES 2 337 492 T3

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 97 amino ácidos

(D) TIPO: amino ácido

35 (E) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 337 492 T3

	(C) CADENAS: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: linear	
5	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:19:	
	TTTTGATATC GATATGGAAT GGCTAAAGAC AAGACCAATC	40
10	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:20:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
15	(A) LONGITUD: 35 pares de base	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENAS: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: linear	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:20:	
25	TTTTGATATC GTTGTGGGA TCCCATTC CATG	35
	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:21:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
30	(A) LONGITUD: 24 pares de base	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENAS: sencilla	
35	(D) TOPOLOGÍA: linear	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:21:	
40	GTTATGACAT ACATACATTC TATG	24
	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:22:	
45	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 35 pares de base	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
50	(C) CADENAS: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: linear	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
55	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:22:	
	CCATGCATTC CTGCTTGTAG TAAAAATTG CGTCC	35
60	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:23:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
65	(A) LONGITUD: 29 pares de base	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENAS: sencilla	

ES 2 337 492 T3

	(D) TOPOLOGÍA: linear	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
5	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:23:	
	CTACAAGCAG GAATGCATGG AGATACACC	29
10	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:24:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 36 pares de base	
15	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENAS: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: linear	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:24:	
	CATCTGAAGC TTAGTAATGG GCTCTGTCCG GTTCTG	36
25	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:25:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
30	(A) LONGITUD: 38 pares de base	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENAS: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: linear	
35	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:25:	
40	CATCTGAAGC TTATCAATAT TGTAATGGGC TCTGTCCG	38
	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:26:	
45	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 54 pares de base	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
50	(C) CADENAS: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: linear	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
55	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:26:	
	CATCTGAAGC TTACTTGCAA CAAAAGGTTA CAATATTGTA ATGGGCTCTG TCCG	54
	(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:27:	
60	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 69 pares de base	
65	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENAS: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: linear	

ES 2 337 492 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

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

5 CATCTGAAGC TTAAAGCGTA GAGTCACACT TGCAACAAAA GGTTACAATA TTGTAATGGG 60
CTCTGTCCG 69

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de base

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

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

25 CATCTGAAGC TTATTGTACG CACAACCGAA GCGTAGAGTC ACACTTG 47

30

35

40

45

50

55

60

65