



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 559**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A01K 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01107271 .7**

86 Fecha de presentación : **23.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1243655**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

54

Título: **Genes y proteínas E6 y E7 modificados del VPH útiles como vacuna.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73

Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72

Inventor/es: **Cid-Arregui, Angel y
Zur Hausen, Harald**

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 284 559 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes y proteínas E6 y E7 modificados del VPH útiles como vacuna.

5 La presente invención se refiere a las secuencias de ADN que codifican para una proteína de fusión de E6 o E7 del VPH, en donde dichas secuencias de ADN están caracterizadas por una combinación de las siguientes propiedades: al menos el 20% de los codones originales se sustituyen por codones que producen un aumento de la traducción en células de mamífero, contienen una mutación que resulta en la producción de una proteína truncada no funcional, y codifican para un componente de la proteína fusión que es un polipéptido altamente inmunogénico capaz de aumentar la inmunogenicidad de las proteínas E6 o E7 en el huésped mamífero. Además, esta invención se refiere a las proteínas de fusión de E6 o E7 modificadas codificadas por dichas secuencias de ADN así como a vectores de expresión que contienen dichas secuencias de ADN. Finalmente, la presente invención se refiere a varios usos de los compuestos arriba mencionados, particularmente como vacunas eficaces en el tratamiento o prevención de una infección por VPH o una neoplasia asociada a una infección por VPH.

15 El carcinoma de cérvix o cuello de útero (cáncer cervical, CC) es el segundo cáncer más común en mujeres en el mundo, y el primero en países en desarrollo. El CC se desarrolla a través de fases intermedias premalignas de severidad creciente conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), de grados 1-3, produciendo el último el desarrollo de cáncer invasivo en aproximadamente el 50% de los casos en un período de 1-2 décadas. Más del 11% de la incidencia global de cáncer en mujeres es debido a infecciones por papilomavirus humano (VPH). Las infecciones por VPH de tipo 16 y 18 se han relacionado con el desarrollo de NIC y CC, siendo el genotipo 16 del VPH el tipo viral más frecuente en la infección de cérvix. Se cree que las proteínas E6 y E7 codificadas por estos tipos de VPH están implicadas en la patogénesis del CC induciendo una proliferación celular anormal. La expresión de E6 y E7 se detecta consistentemente en tejidos y células tumorales de CCs asociados a VPH. Además, los genes E6 y E7 de VPH de tipo 25 16 y 18 bastan para transformar células epiteliales en cultivo (zur Hausen, Biochim. Biophys. Acta 1288(2) (1996): F55-78).

Existen evidencias cada vez mayores de que las proteínas E6 y E7 codificadas por VPH de tipo 16 y 18 pueden ser dianas inmunológicas efectivas para el rechazo del tumor por el huésped. Se están realizando esfuerzos para desarrollar vacunas preventivas y terapéuticas que puedan ser útiles en el tratamiento y prevención de la neoplasia asociada al VPH. Las diferentes estrategias empleadas hasta ahora para inducir una respuesta inmune contra las proteínas del VPH de tipo 16 y 18 son: (a) uso de péptidos antigénicos sintéticos, (b) uso de microorganismos recombinantes (bacilo recombinante Calmette-Guerin; BCG), (c) uso de vacunas de ADN utilizando genes virales salvajes y (d) uso de partículas pseudovirales (Virus-like particles, VLPs).

35 Sin embargo, desafortunadamente, las estrategias descritas arriba muestran una serie de inconvenientes que han impedido hasta ahora el desarrollo de una vacuna segura y eficiente. Por lo que se refiere al uso de péptidos antigénicos sintéticos debe subrayarse que la identificación de péptidos inmunoreactivos, específicos del VPH es muy compleja. Exige gran número y cantidades de péptidos para que las vacunas sean efectivas y de un amplio espectro. Por otra parte, los péptidos sintéticos no contienen modificaciones postraduccionales (p.ej., glicosilación, sulfatación, fosforilación) normalmente presentes en las proteínas nativas y por lo tanto no son suficientemente efectivas como vacunas. Se han utilizado como inmunógenos sistemas de distribución de vacunas basados en el BCG que expresan la proteína tardía L1 del VPH 6b o la proteína temprana E7 del VPH 16. Sin embargo, las respuestas inmunes obtenidas con estos sistemas han sido incluso menores que las obtenidas con vacunas proteína/adyuvante y, así, se considera poco probable que este sistema sea útil como estrategia de vacuna de un solo componente. Por lo que se refiere a las vacunas de ADN se ha observado que la expresión de genes salvajes del VPH es bastante baja incluso si se expresan bajo promotores fuertes, como el del citomegalovirus (CMV). En cuanto al uso de partículas pseudovirales (VLPs) se debe decir que las verdaderas VLPs están hechas de la proteína L1 (cápsida) de un tipo específico de VPH. Por lo tanto, puede que solo sean útiles como vacunas profilácticas más que como vacunas terapéuticas. También se han descrito VLPs pseudotipadas que contenían, por ejemplo, epítopos de E7 del VPH-16 y pueden ser útiles como vacunas profilácticas y terapéuticas. Sin embargo, una limitación importante es que las VLPs se producen en células de insecto o en levaduras. Hasta ahora no se han establecido sistemas de producción apropiados en células de mamífero. Por lo tanto en estos sistemas se pierden epítopos críticos que dependen de las modificaciones postraduccionales que tienen lugar en células humanas.

55 Por tanto, el propósito de la presente invención es proporcionar una vacuna segura y efectiva, preferentemente una vacuna genética, para el tratamiento o prevención de una infección por VPH o una neoplasia asociada al VPH.

60 Según la invención esto se consigue con el objeto definido en las reivindicaciones. La presente invención proporciona secuencias de ADN para inducir respuesta inmune a las proteínas E6 y/o E7 del VPH oncogénico en un huésped animal, preferentemente administrando vectores que contienen dichas secuencias de ADN, p.ej. plásmidos, amplicon del virus del herpes simple tipo I o vectores recombinantes derivados del virus del bosque de Semliki. Dichas secuencias de ADN codifican proteínas del VPH como proteínas de fusión que son inmunogénicas pero no son capaces de inducir transformación celular. Las secuencias de ADN de la invención tienen las siguientes características:

65 (a) Las secuencias de ADN de los genes E6/E7 del VPH se han modificado para transformar su uso de codones en uno más próximo al de los genes humanos, es decir, al menos el 20% de los codones originales se han sustituido por codones que producen un aumento de la traducción en células de mamífero, (b) los genes se han modificado

ES 2 284 559 T3

por mutación para hacerlos no funcionales, de ese modo inhabilitando su capacidad oncogénica (las deleciones son, preferentemente, mutaciones puntuales, porque estas conducen a la pérdida de epítomos potencialmente esenciales), (c) los genes del VPH se han fusionado a proteínas altamente inmunogénicas para aumentar su inmunogenicidad en el huésped (no se espera que estas fusiones enmascaren epítomos de las proteínas del VPH, ya que los fragmentos fusionados tienen la suficiente longitud para evitar este problema), y, preferentemente, la expresión de los genes del VPH se produce por medio de vectores recombinantes, HSV deficientes en replicación, SFV o plásmidos de alto número de copia, o combinaciones de los mismos.

Este planteamiento ofrece una serie de ventajas, a saber:

(a) Se obtienen niveles de expresión más altos de la proteína del VPH como resultado de las mutaciones silenciosas introducidas en los genes del VPH para hacer su uso de codones más próximo al humano. Esto resulta en una respuesta del huésped más eficiente en ensayos de inmunización comparado con el uso de genes salvajes del VPH.

(b) Las proteínas y genes del VPH generadas por la presente invención se expresan en células humanas y, a diferencia de las proteínas expresadas en otros sistemas como bacteria, levaduras o células de insecto, contienen las modificaciones postraduccionales normalmente encontradas en proteínas expresadas en células humanas. Esto es decisivo para un reconocimiento adecuado de las proteínas del VPH por el sistema inmune del huésped.

(c) Puesto que las proteínas del VPH se expresan fusionadas a proteínas que se sabe son altamente inmunogénicas, provocan respuestas inmunes más fuertes en el huésped animal.

(d) Las proteínas del VPH no transforman células ni *in vitro* ni en el huésped animal porque en ningún caso se expresan como polipéptidos completos. Los genes de fusión del VPH expresan proteínas incompletas, cuyas funciones están deterioradas. Además, las proteínas del VPH se expresan como fusiones a proteínas citoplásmicas y por lo tanto no pueden alcanzar el núcleo donde ejercen sus funciones.

(e) Las proteínas del VPH se expresan, preferentemente, etiquetadas con una secuencia específica, que puede ser fácilmente detectada en Western blots y por inmunofluorescencia con la ayuda de anticuerpos disponibles comercialmente.

(f) La combinación de varios vectores virales y de estos con vectores plasmídicos asegura una inmunización más eficiente, ya que previene la neutralización del vector por una reacción inmune provocada en una estimulación previa.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a secuencias de ADN que codifican proteínas de fusión de E6 o E7 del VPH, en donde dicha secuencia de ADN se caracteriza por una combinación de las siguientes propiedades:

(a) al menos el 20% de los codones originales se sustituyen por codones que producen un incremento en la traducción en células de mamífero;

(b) contiene una mutación que resulta en la producción de una proteína truncada no funcional; y

(c) codifica un componente de la proteína de fusión que es un polipéptido altamente inmunogénico capaz de aumentar la inmunogenicidad de las proteínas E6 o E7 en el huésped mamífero.

La expresión “codones originales” se refiere a los codones que se encuentran en la correspondiente versión salvaje del VPH.

La expresión “incremento en la traducción en células de mamífero” se refiere a los genes que resultan de introducir mutaciones silenciosas en las secuencias del VPH, como se describe en la presente invención, que crea un marco abierto de lectura compuesto totalmente por codones preferidos en humanos, y así produce un aumento de la expresión de las proteínas que codifican en células de mamífero.

El término “mutación que resulta en la producción de una proteína truncada, no funcional” se refiere a cualquier mutación que lleva a la producción de una versión no funcional de la proteína. Preferentemente, tal mutación lleva a una versión truncada de la proteína. Ejemplos de mutaciones apropiadas incluyen una mutación, en donde al menos un codón se ha delecionado o una mutación que lleva a una terminación prematura de la traducción. Tal mutación es, p.ej., la sustitución de un codón que codifica para un determinado aminoácido por un codón de terminación, una inserción o deleción de uno o dos nucleótidos que resulta en una mutación con cambio en el marco de lectura etc. El término “proteína o gen no funcional” significa que los genes y proteínas mutantes del VPH de la presente invención son “no transformantes ni *in vitro* ni *in vivo*” significando que se ha eliminado la capacidad de los genes y proteínas E6 o E7 para transformar células a un fenotipo tumorigénico como se demuestra mediante ensayos estándar. El experto en la materia puede determinar fácilmente si una mutación particular produce un gen o proteína E6 o E7 con las características deseadas, es decir, que es “no transformante” de acuerdo a procedimientos estándar. Estos incluyen:

1) *In vitro*: ensayos de transformación de células NIH 3T3 y queratinocitos primarios humanos. Rutinariamente se han identificado genes transformantes (oncogenes) mediante el uso de ensayos en los que focos transformados resultan de la transfección de ADN tumoral o recombinante en células NIH 3T3 (Todaro

ES 2 284 559 T3

et al., PNAS USA 51: 66-73, 1964; Jainchill *et al.*, J. Virol. 4: 549-553, 1969; Andersson *et al.*, Cell 16: 63-75, 1979). Estas células son fibroblastos murinos mantenidas como líneas celulares no tumorigénicas inhibidas por contacto. La transferencia de ADN que contenga un oncogén activo producirá ocasionalmente focos de células morfológicamente alteradas que tienen propiedades tumorigénicas.

- 5
- 2) *In vivo*: Rutinariamente se realizan ensayos de tumorigenicidad en ratones inmunodeficientes mediante la inoculación de células transformadas humanas o de ratón. Se ha demostrado que células transfectadas que expresan los genes del VPH E6 y E7 y líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales infectados por VPH, como las células HeLa, son tumorigénicas (Lichy *et al.* Cell Growth Differ. 3: 541-548, 1992, Stanbridge, Nature 260: 17-20, 1976).
- 10

En una forma de realización preferida, la secuencia de ADN de la presente invención codifica la proteína E7 del VPH con las características descritas arriba.

15 En otra forma de realización preferida, al menos el 50% de los codones originales de la secuencia de ADN de la presente invención se sustituyen por codones que producen un aumento de la traducción en células de mamífero; ejemplos de sustituciones adecuadas se muestran p.ej., en las figuras 1 y 2.

20 En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de ADN de la presente invención contiene una mutación puntual de cambio de marco de lectura que produce una terminación prematura de la traducción.

El experto en la materia sabe de polipéptidos o partes de los mismos que son adecuados como componentes de la fusión para las proteínas E6 o E7 y que son altamente inmunogénicos en mamíferos, particularmente en humanos. Ejemplos de polipéptidos adecuados incluyen:

- 25
- 1) Proteína pequeña de la envuelta del virus de la hepatitis B (HBsAg-S). Esta proteína tiene la capacidad de auto ensamblarse con membranas procedentes del huésped para formar partículas subvirales vacías, que se liberan en la luz de un compartimento pre-Golgi y que son con posterioridad secretadas (Ganem, "Hepadnaviridae and their replication" p2703-37, in Fields, Knipe and Howley (eds.), Fields Virology 3rd ed. 1996, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia). E6 o E7 se pueden fusionar a la zona C-terminal de la proteína que permanece expuesta en la superficie de la partícula subviral.
- 30
- 2) Glicoproteína E2 del virus del bosque de Semliki (SFV). E2 es un componente de la espícula del virión del SFV y un antígeno principal para anticuerpos neutralizantes (Schlessinger and Schlessinger, "Togaviridae: the viruses and their replication" in Fields, Knipe and Howley (eds.), Fields Virology 3rd ed. 1996, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia). E6 o E7 se pueden fusionar a la zona N-terminal de la proteína E2 que está expuesta en la superficie de la envuelta viral o de la membrana plasmática de células que expresan E2.
- 35
- 3) Proteína precursora del β -amiloide humana (APP). APP es una proteína transmembrana con una región extracelular grande y una cola citoplásmica pequeña. Normalmente es cortada por una proteasa para dar lugar a un péptido β de 40 aminoácidos (amiloide), que se encuentra en las placas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, o a un fragmento menor llamado p3, que puede asociarse con la matriz extracelular ("Principles of neural Science", Kandel, Schwartz and Jessell, (eds.) 3rd ed., 1991, Elsevier, New York). E6 y E7 se pueden insertar en la parte extracelular de la APP y se cree que puedan liberarse junto con el péptido β o el fragmento p3.
- 40
- 4) Cromogranina B humana (hCgB). Aunque la hCgB es una proteína implicada en la vía secretora regulada, se ha demostrado que tras transfección se secreta constitutivamente en células sin vía regulada, como las células HeLa, (Kaether and Gerdes, FEBS Letters 369: 267-271, 1995). E6 o E7 se pueden fusionar a la región C-terminal de la hCgB.
- 50
- 5) La β -galactosidasa bacteriana, que se sabe que es altamente inmunogénica (Fijikawa *et al.* Virology 204: 789-793, 1994). E6 o E7 se pueden fusionar a las regiones N- o C-terminal de la proteína. Como el producto de fusión es una proteína soluble no de membrana que puede difundir al núcleo, E6 o E7 es un mutante de delección (inactivo). Alternativamente, se añade a la fusión un péptido señal que dirige el producto hacia la superficie celular.
- 55
- 6) Fusión de las mitades N- o C-terminal de E6 o E7 juntas y fusión de la proteína quimérica resultante a cualquiera de las proteínas descritas arriba.
- 60

La presente invención se refiere particularmente, pero no exclusivamente, a los genes y proteínas E6 y E7 de los genotipos VPH-16 y VPH-18. Sin embargo, se valorará que la invención se extiende a cualquier genotipo del VPH y a otros genotipos del VPH que puedan tener potencial oncogénico o patológico.

65 En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a genes quiméricos que codifican una poliproteína que contiene E6 y E7 del VPH-16 y E6 y E7 del VPH-18, bien completos o como fragmentos de delección que contienen la mitad N- o C-terminal de dichas proteínas, fusionados juntos y a polipéptidos o partes de los mismos

ES 2 284 559 T3

mencionados arriba. Esto permite la inmunización contra el VPH16 y el VPH18 utilizando un solo producto como inmunógeno.

5 El experto en la materia valorará que la fusión de E6 y/o E7 a las proteínas 1-4 de la lista de arriba elimina la translocación de las primeras al núcleo, por lo tanto interfiriendo con su función. Además, la secreción o exposición en la superficie de las proteínas de fusión es intencionada para facilitar su reconocimiento por el sistema inmune.

10 En una forma de realización particular preferida, la presente invención se refiere a secuencias de ADN en donde las partes (a) y (b) comprenden la región codificante de las secuencias ADN como se representa en las figuras 1, 2, 3, o 4 incluyendo la etiqueta Flag o no. Una forma de realización aún más preferida de las secuencias de ADN de la presente invención, es la que comprende la región codificante de la secuencia de ADN como se representa en la figura 5, incluyendo la etiqueta Flag o no.

15 Preferentemente, las secuencias de ADN que codifican para las proteínas de fusión mutantes del VPH E6 y E7 están en un vector o en un vector de expresión. El experto en la materia está familiarizado con ejemplos de esto. En el caso de un vector de expresión para *E. coli* estos son p.ej. pGEMEX, derivados de pUC, pGEX-2T, pET3b, vectores de expresión basados en T7 y pQe-8. Para la expresión en levaduras p.ej., pY100 y Ycpad1 deben mencionarse mientras que pKCR, pEFBOS, cDM8, pMSCND y pCEV4 deben mencionarse para la expresión en células animales. 20 El vector de expresión de baculovirus pAcSGHisNT-A es especialmente adecuado para la expresión en células de insecto. Las secuencias de ADN de la presente invención también pueden estar contenidas en virus recombinantes que tengan casetes de expresión apropiados. Virus adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen baculovirus, virus de la vacuna, virus Sindbis, SV40, virus Sendai, adenovirus, virus AAV, o parvovirus como el MVM o el H-1. El vector también puede ser un retrovirus, como MoMULV, MoMuLV, HaMuSv, MuMTV, RSV, o 25 GaLV. Plásmidos y virus recombinantes particulares preferidos son piREs-Neo2 (Clontech, Heidelberg, Alemania), pTet-On (Clontech), pHSVPUK (Geller *et al.*, PNAS USA 87 (1990), 8950-8954), amplicones de HSV y vectores de SFV recombinante. Para su expresión en mamíferos, las secuencias de ADN de la invención se unen operativamente a un promotor adecuado, p.ej., al "promotor temprano inmediato" del citomegalovirus humano (pCMV), promotor temprano y amplificador del SV40, promotor SR α (Takebe *et al.* Mol. Cell. Biol. 8: 466-472, 1988), sistema de expresión de genes Tet-On / Tet-Off, el promotor temprano inmediato E4/5 del HSV-1 (Geller *et al.*, PNAS USA 87: 30 8950-8954, 1990).

Para generar secuencias de ADN que codifican proteínas de fusión de E6 y E7 que contienen las modificaciones discutidas arriba y para construir los vectores de expresión que contienen las secuencias de ADN según la invención es 35 posible utilizar métodos generales conocidos en la materia. Estos métodos incluyen p.ej., técnicas de recombinación *in vitro*, métodos sintéticos y métodos de recombinación *in vivo* como se describen por ejemplo en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edidition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

40 Además, la presente invención se refiere a las células huésped que contienen las secuencias de ADN o vectores descritos arriba. Estas células huésped incluyen bacterias, levaduras, células de insecto y mamífero, preferentemente células de mamífero. Las cepas de *E. coli* HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21, XL1Blue, y SG 13009, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las células de insecto sf9 y las células animales L, A9, 3T3, FM3A, BHK, SW13 humanas, CHO, COS, Vero y HeLa son preferidas. Los métodos para transformar estas células huésped, 45 para seleccionar los transformantes fenotípicamente y para expresar el ADN según la invención son conocidos en la materia.

La presente invención también se refiere a una proteína de fusión del VPH E6 o E7 codificada por las secuencias de ADN descritas arriba. La proteína de fusión del VPH E6 o E7 se suministra como material aislado, purificado 50 y por lo tanto libre de otras proteínas. Dichas proteínas de fusión del VPH se expresan, preferentemente, en células humanas y, a diferencia de las proteínas expresadas en otros sistemas tal como bacterias, levaduras o células de insecto, contienen las modificaciones postraduccionales normalmente encontradas en proteínas expresadas en células humanas. Esto puede ser de una importancia decisiva para un reconocimiento adecuado de las proteínas del VPH por el sistema inmune del huésped.

55 Además, la presente invención se refiere a un método para producir las proteína de fusión de E6 o E7 arriba descritas, para lo cual p.ej., se cultivan células huésped de la invención bajo condiciones que permitan la síntesis de la proteína y la proteína posteriormente se aísla de las células en cultivo y/o del medio de cultivo. El aislamiento y purificación de las proteínas recombinantes producidas se puede llevar a cabo por métodos convencionales incluyendo cromatografía preparativa y separaciones de afinidad e inmunológicas mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales o policlonales. 60

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que consta de una secuencia de ADN y un vector de expresión de la invención o, alternativamente, la proteína de fusión del VPH E6 o E7 codificada por dicha 65 secuencia de ADN en un soporte farmacéuticamente aceptable.

ES 2 284 559 T3

Finalmente, la presente invención se refiere a varios usos de las secuencias de ADN de la invención, vectores de expresión o proteínas de fusión del VPH E6 o E7. Los usos preferidos son:

- 5 (a) Preparación de una vacuna para la prevención o tratamiento de una infección por VPH o neoplasia asociada con una infección por VPH. Preferentemente, la vacuna es una vacuna genética basada en las secuencias de ADN de la invención insertadas en un vector apropiado bajo el control de un promotor adecuado, p.ej., un vector o promotor como los descritos arriba. Una vacuna semejante se puede usar para estimular la respuesta inmune humoral y/o celular en sujetos que se puedan beneficiar de tales respuestas por protección contra o tratamiento de posibles infecciones por VPH o por rechazo de células de tumores o lesiones que están infectadas por VPH y expresan las proteínas virales.
- 10 (b) Producción de anticuerpos policlonales o monoclonales que pudieran ser útiles como agentes terapéuticos. Tales anticuerpos se pueden generar según métodos bien conocidos.
- 15 (c) Detección de anticuerpos específicos o linfocitos T citotóxicos en sujetos infectados por VPH, es decir, uso en ensayo diagnóstico. Formatos de ensayo adecuados (RIA, ELISA, etc.) son bien conocidos para el experto en la materia.
- 20 (d) Generación de una línea de ratones transgénicos utilizando, p.ej., las secuencias de ADN de la invención bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina. Tal línea de ratones podría ser útil para ensayar vacunas contra el VPH.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1

Secuencia de VPH16 EE7T

30 Se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (código de una letra) del gen E7 del VPH-16 mutagenizado (EE7T). Las mutaciones silenciosas introducidas para crear un marco abierto de lectura con los codones preferidos en humanos están indicadas en negrita. Las secuencias que codifican para las etiquetas hexa-His o Flag están subrayadas. El codón de terminación está indicado con un asterisco.

35 Figura 2

Secuencia de VPH16 EE6T

40 Se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (código de una letra) del gen E6 del VPH-16 mutagenizado (EE6T). Las mutaciones silenciosas introducidas para crear un marco abierto de lectura con los codones preferidos en humanos están indicadas en negrita. Las secuencias que codifican para las etiquetas hexa-His o Flag están subrayadas. El codón de terminación está indicado con un asterisco.

45 Figura 3

Secuencia de VPH18 EE7T

50 Se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (código de una letra) del gen E7 del VPH-18 mutagenizado (EE7T). Las mutaciones silenciosas introducidas para crear un marco abierto de lectura con los codones preferidos en humanos están indicadas en negrita. Las secuencias que codifican para las etiquetas hexa-His o Flag están subrayadas. El codón de terminación está indicado con un asterisco.

Figura 4

55 *Secuencia de VPH18 EE6T*

Se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (código de una letra) del gen E6 del VPH-18 mutagenizado (EE6T). Las mutaciones silenciosas introducidas para crear un marco abierto de lectura con los codones preferidos en humanos están indicadas en negrita. Las secuencias que codifican para las etiquetas hexa-His o Flag están subrayadas. El codón de terminación está indicado con un asterisco.

Figura 5

Gen de fusión HbsAg-EE7T

65 Se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (código de una letra) del gen de fusión HbsAg-EE7T. Los fragmentos fusionados están separados por tres puntos. Las mutaciones silenciosas introducidas en el gen E7 del VPH-16 (EE7T) para convertir el marco abierto de lectura en uno con los codones preferidos

ES 2 284 559 T3

en humanos están indicadas en negrita. La secuencia que codifica para la etiqueta Flag está subrayada. El codón de terminación está indicado con un asterisco.

Figura 6

5

Análisis por imagen confocal de la expresión de las proteínas de fusión de E7 del VPH-16 codificadas por los genes mutantes EE7T y E7T

10 Se transfectaron células Vero crecidas en cubreobjetos con los plásmidos pIRES-Neo2/EE7T o pIRES-Neo2E7T utilizando el reactivo de transfección "FuGene" (Roche, Basilea, Suiza). Las células se incubaron durante 48 horas, se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% y se tiñeron mediante incubaciones secuenciales con anticuerpos monoclonales M2 anti-Flag (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados a cy2 (Dianova, Hamburgo, Alemania).

15 Figura 7

Análisis por Western blot de la expresión de las proteínas de fusión de E7 del VPH-16 codificadas por los genes EE7T y E7T

20 Se transfectaron células HeLa como se describe en la Figura 6. Las células se lisaron tras 24 horas en tampón SDS, las proteínas se separaron mediante PAGE (poliacrilamida al 15%), se transfirieron a membrana de PVDF (Immobilon-p, Millipore, Eschborn, Alemania) y se hibridaron con anticuerpos monoclonales M2 anti-Flag conjugados con peroxidasa de rábano, cuya actividad se detectó mediante el ensayo de ECL.

25 La presente invención se explica mediante los ejemplos.

Ejemplo 1

Mutagénesis y expresión del gen E7 del VPH tipo 16

30

El gen E7 del VPH-16 se mutagenizó *in vitro* para introducir 64 mutaciones silenciosas que crean un marco abierto de lectura compuesto por los codones preferidos en humanos. Además, los genes mutantes del E7 se fusionaron a etiquetas de hexahistidina y Flag.

35 Los genes mutantes E7 se produjeron sintéticamente mediante pasos secuenciales de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores:

(a)

40

5'-GGA TCC AAG CTT GCC GTG ATC ATG CAC GGC GAC ACC CCC ACC TTG
CAC GAG TAC ATG TTG GAC TTG CAG CCC GAG ACC ACC GAC CTG TAC TGC
TAC GA-3'

45

(b) 5'-GTA GTG GGC GCG GTC GGG CTC GGC CTG GCC GGC GGG GCC GTC
GAT CTC GTC CTC CTC CTC GGA GCT GTC GTT CAA CTG C-3'

50

(c) 5'-GCC CGA CCG CGC CCA CTA CAA CAT CGT GAC CTT CTG CTG CAA
GTG CGA CTC CAC CCT GCG CCT GTG CGT GCA GAG CAC-3'

55

(d) 5'-CCC GGG GAA TTC CTT AGG GCT TCT GGC TGC AGA TGG GGC ACA
CGA TGC CCA GGG TGC CCA TCA GCA GGT CCT CCA AGG TGC GGA TGT CCA
CGT GG-3'

65

ES 2 284 559 T3

(e)

5' -GAC CTG TAC TGC TAC GAG CAG TTG AAC GAC AGC TCC GA-3'

(f)

5' -AGG TGC GGA TGT CCA CGT GGG TGC TCT GCA CGC A-3'

(g)

5' -CAA GCT TGC TAG CAT GCA CCA CCA CCA CCA CCA CGG CGA CAC CCC
CAC CTT GCA CGA GTA-3'

(h)

5' -CAA GCT TGC TAG CAT GCA CCA CCA CCA CCA CCA CGA CGA GAT CGA
CGG CCC CGC CGG CCA-3'

(i)

5' -CGG ATC CGA ATT CTT ACT TGT CGT CGT CGT CCT TGT AGT CGG GCT
TCT GGC TGC AGA TGG GGC ACA-3'

En el primer paso de la PCR, se usaron los cebadores (b) y (e) (PCR1) y los cebadores (c) y (f) (PCR2) para generar los fragmentos respectivos por extensión de la cadena sin utilizar molde. En un segundo paso, los productos de PCR1 y PCR2 se utilizaron para amplificar un fragmento individual sin utilizar cebadores (PCR3). En un tercer paso, el producto de PCR3 se utilizó como molde para amplificar el gen E7 completo con los cebadores (a) y (d) (PCR4).

En un paso final de PCR, el producto de PCR4 (EE7) se utilizó como molde para amplificar lo siguiente: (1) utilizando los cebadores (g) e (i) se sintetizó la secuencia completa de E7 fusionada a las secuencias que codifican la etiqueta hexa-His (epítipo HHHHHH) en su zona N-terminal y la etiqueta Flag (epítipo DYKDDDDK) en su zona C-terminal (E7 mejorado con marcadores: EE7T); (2) usando los cebadores (h) e (i) se sintetizó un E7 truncado (EE7TΔ1) sin los primeros 35 residuos y que contiene las etiquetas His y Flag como se ha descrito arriba.

Los genes mutantes E7 etiquetados se aislaron de las mezclas de reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se digirieron con NheI y EcoRI y se clonaron en el sitio múltiple de clonaje del plásmido pIRES-Neo2 (Clontech, Heidelberg, Alemania) digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. Después de transformar bacterias DH5α, se identificaron y secuenciaron clones individuales. Los clones con la secuencia correcta se expandieron y se utilizaron para purificar los plásmidos correspondientes. Como control, un gen E7 salvaje y un mutante truncado sin los primeros 35 residuos, ambos etiquetados de la misma manera que los mutantes de EE7T descritos arriba, se clonaron por PCR (genes E7T y E7Δ1T), y se insertaron posteriormente en los sitios NheI y EcoRI del plásmido pIRES-Neo2.

El producto EE7 de PCR4 también se clonó en un vector pBluescript (Stratagene, Ámsterdam, Holanda) y se utilizó para mutagénesis que dio como resultado un mutante de delección doble sin los residuos 26-32 y 70-74. El producto EE7 de PCR4 se utilizó como molde para amplificación como sigue: (1) utilizando los cebadores (g) e (i) se generó un mutante de delección de EE7T sin los residuos 26-32 y 70-74 (EE7TΔ2,3) con etiquetas His y Flag, (2) utilizando los cebadores (h) e (i) se generó un EE7T truncado sin los primeros 35 residuos y sin los residuos 70-74 (EE7TΔ1,3) con las etiquetas His y Flag como se ha descrito arriba.

Ejemplo 2

Expresión de los genes de fusión de EE7T en células de mamífero

La expresión de los genes de fusión de EE7T descritos en el Ejemplo 1, arriba, se ensayó *in vitro* mediante análisis de inmunofluorescencia y Western blot comparada con la de controles E7T. Los plásmidos de arriba se utilizaron para transfección transitoria usando líneas celulares eucarióticas de ratón (C-26), mono (Vero 2-2) y humanas (HeLa). La línea celular Vero 2-2 contiene el gen y promotor IE2 del HSV-1 (ICP27). Esta línea fue originalmente establecida por R.M. Sandri-Goldin *et al.* (Smith *et al.* Virology 186 (1992), 74-86). A diferentes tiempos de expresión las células se fijaron con paraformaldehído y se procesaron para inmunodetección o se lisaron en tampón de carga con SDS y se analizaron por Western blot. En ambos casos las proteínas de fusión de E7 se detectaron con anticuerpos monoclonales

ES 2 284 559 T3

de ratón específicos para los epítomos hexa-His (anti-His-tag Ab-1, Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Alemania) o Flag (anti-Flag M2, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

5 Análisis de las imágenes de las preparaciones de inmunofluorescencia mostraron expresión de las proteínas mutantes en el núcleo de las células transfectadas (Figura 6). Western blots incubados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítomo Flag mostraron que la expresión de los genes E7 mutagenizados (EE7 y sus mutantes de delección descritos arriba) fue al menos dos órdenes de magnitud mayor que aquella del gen E7 equivalente hecha de codones salvajes (VE7 y sus mutantes de delección) (Figura 7).

10 Ejemplo 3

Clonaje y expresión de genes de fusión E7/HBsAg

15 Para aumentar el potencial antigénico de E7, se crearon proteínas de fusión entre el marco abierto de lectura del EE7 etiquetado y un gen que codifica el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg). El gen de fusión se creó mediante clonaje con PCR de los genes HbsAg y EE7. El plásmido pRc/CMV-HBs (Aldevron, Fargo, USA) sirvió como molde para amplificar el gen HbsAg utilizando los cebadores 5'-CTC GAG GAT TGG GGA-3' y 5'-GAT ATC AAT GTA TAC CCA AAG A-3'. El fragmento resultante contiene la secuencia completa del marco abierto de lectura del HbsAg excepto el codón de terminación, que se reemplazó por un sitio EcoRV. Los genes mutantes de EE7T se amplificaron utilizando como molde el gen EE7 completo descrito en Ejemplo 1 y como cebadores para el extremo 5' los oligonucleótidos 5'-GAT ATC GAG GAG GAC GAG ATC GA-3' o 5'-GAT ATC ATG CAC GGC GAC A-3' y para el extremo 3' el oligonucleótido (i) descrito en el Ejemplo 1. Los genes EE7 amplificados de esta manera se cortaron con EcoRV y se ligaron en el extremo 3' del HbsAg generado arriba para producir genes de fusión HbsAg-EE7 que expresan bien el gen EE7 completo, o los mutantes de delección EE7TΔ1 o Δ.

25 Los genes de fusión HbsAg-EE7T se clonaron en el sitio múltiple de clonaje del plásmido pIRESNeo2 y se utilizaron para transfección transitoria usando líneas celulares eucarióticas de ratón (C-26, librería de tumor, DKFZ, Heidelberg, Alemania), mono (Vero 2-2) y humanas (HeLa).

30 Ejemplo 4

1. Estudios de transformación de los genes del VPH mejorados

35 Se ha acumulado evidencia experimental que demuestra que E6 y E7 de los VPH16 y VPH18 tienen potencial de transformación. Cuando se expresan bajo el control de promotores heterólogos fuertes, se ha mostrado que estos genes transforman células de ratón establecidas (Kanda *et al.*, J. Virol. 62: 610-613, 1988; Vousden *et al.*, Oncogene Res. 3:167-175, 1989) y que immortalizan queratinocitos primarios de prepucio murinos y humanos (Halbert *et al.*, J. Virol. 65:473-478, 1991; Hudson *et al.*, J. Virol. 64: 519-526, 1990; Sedman *et al.*, J. Virol. 65: 4860-4866).

40 El potencial de transformación de los genes mejorados de la presente invención y de sus derivados (proteínas de fusión como la de la Figura 5 y otras en que el gen del VPH tiene una delección de al menos el 50%) se ensayaron mediante métodos estándar usando células de ratón NIH 3T3 y queratinocitos humanos primarios. Sus homólogos salvajes y vectores vacíos se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

45 Los genes mejorados del VPH y sus construcciones de ADN de fusión se subclonaron en el sitio múltiple de clonaje del plásmido pIRESNeo2 (Clontech, Heidelberg, Alemania). Los plásmidos resultantes se amplificaron en *E. coli* y se purificaron con resinas (Quiagen, Hilden, Alemania), se eluyeron, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en agua desionizada, estéril. La cantidad y pureza del ADN se determinaron mediante medidas espectrofotométricas de absorbancia a 260 y 280 nm y por electroforesis en gel de agarosa. Las células NIH 3T3 (ATCC, Manassas) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con L-glutamina y suero fetal de ternera al 10%.

50 La transfección de células NIH 3T3 con ADN de plásmidos se llevó a cabo utilizando el reactivo de transfección FuGene™ 6 (Roche, Mannheim, Alemania) esencialmente como describe el fabricante. Las células sembradas a 3x10 en placas de 100 mm se transfectaron al día siguiente con 3 µg del plásmido a ensayar. Cada transfección se hizo por triplicado. Tras 48 horas de incubación a 37°C las células se retiraron por tripsinización y bien se ensayó la formación de colonias en agar blando o bien se subcultivaron en tres placas de 100 mm y se incubaron durante otras 24 horas a 37°C antes de que se llevara a cabo la selección en medio que contiene Geneticin (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) a una concentración de 500 µg/ml. Para los ensayos de formación de colonias en agar blando, las células tripsinizadas se sembraron en agar al 0.4% en medio de cultivo a una densidad de 10⁵ células por placa de 60 mm y se incubaron a 37°C. La formación de colonias se contó en placas por duplicado tras dos semanas. Las colonias resistentes a neomicina se seleccionaron mediante suplemento de Geneticin a monocapas de células subconfluentes, las células se tripsinizaron y se ensayaron para la formación de colonias en agar blando como se ha descrito arriba.

65 La transfección de queratinocitos humanos primarios con ADN de plásmidos se llevó a cabo usando el reactivo de transfección FuGene™ 6 como arriba. Los queratinocitos se crecieron en medio KGM (kit KMK2, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en placas de 30 mm. Las células se transfectaron en el pase 5 con 5 µg de ADN. Tras acercarse a la confluencia, los cultivos se repartieron en una proporción de 1:2 y se llevó a cabo la selección con 100 µg de Geneticin por ml.

ES 2 284 559 T3

Todos los genes de fusión mejorados del VPH ensayados fracasaron en la producción de focos de células NIH 3T3 en agar blando y en la inmortalización de queratinocitos humanos primarios.

2. Estudios de inmunogenicidad de los genes mejorados del VPH

5 Los genes mejorados del VPH se subclonaron en el plásmido pHSVPUC (Geller *et al.*, PNAS USA 87: 8950-8954, 1990) y las construcciones recombinantes resultantes se usaron para generar vectores del amplicon del HSV-1 como se ha descrito (Cid-Arregui, y Lim en Cid-Arregui y Garcia (eds), "Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy", Biotechniques Books, Eaton Publishing, Natick), y estos utilizados para estudios de inmunización en ratones BALB/c. 10 Se utilizaron grupos de cinco ratones (de ocho semanas de edad, hembras) para cada experimento de inmunización. En el día 0, se inocularon subcutáneamente 50 μ l de una suspensión de 10^3 - 10^4 partículas virales en suero salino. En el día 14, una segunda dosis de la formulación se aplicó de la misma manera. En el día 28, los ratones se sangraron.

15 Se midieron las respuestas de anticuerpos en el suero contra E6 y E7 utilizando placas cubiertas con proteínas recombinantes E6 o E7 usando métodos estándar. Los sueros se diluyeron en PBS, pH 7.2, que contenía 1 mg/ml de caseína, Tween 20 al 0.5% y alfaazurina A al 0.002%.

20 Tras lavar las placas, se añadieron 0.1 ml/pocillo del suero a ensayar en la dilución apropiada, y se incubaron las placas durante 1 hora a 38°C. Para detectar el anticuerpo unido, se añadieron 0.1 ml de una solución de 0.1 μ g/ml de IgG+IgM (específica para las cadenas H y L) de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano en PBS pH 7.2 suplementado como arriba. Las placas se incubaron una hora a 20°C y se lavaron seis veces con PBS pH 7.2 con Tween 20 al 0.5%. Después se añadieron 0.1 ml de sustrato TMB (3,3', 5,5'tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Tras 10 minutos de incubación a 20°C la reacción se paró añadiendo 50 μ l de H₂SO₄ 0.5M. Se llevaron a 25 cabo medidas colorimétricas en un espectrofotómetro de haz vertical a 450 nm.

Todos los ratones inmunizados con vectores que expresan genes mejorados E6 y E7 del VPH separados o como genes de fusión como se describe en la presente invención produjeron una respuesta significativa tras la inmunización que fue claramente mayor que la producida por los controles no-mejorados.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una secuencia de ADN que codifica para una proteína de fusión de E6 o E7 del VPH, en donde dicha secuencia de ADN se **caracteriza** por una combinación de las siguientes propiedades:
- (a) al menos el 20% de los codones originales se han sustituido por codones que producen un aumento en la traducción en células de mamífero;
 - 10 (b) contiene una mutación que resulta en la producción de una proteína truncada no funcional; y
 - (c) codifica para un componente de la proteína de fusión que es un polipéptido altamente inmunogénico capaz de aumentar la inmunogenicidad de la proteína E6 o E7 en el huésped mamífero.
- 15 2. La secuencia de ADN de la reivindicación 1, en donde la proteína del VPH es una proteína E7.
3. La secuencia de ADN de las reivindicaciones 1 o 2, en donde al menos el 50% de los codones originales se han sustituido por codones que producen un aumento de la traducción en células de mamífero.
- 20 4. La secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la mutación es una mutación puntual con cambio en el marco de lectura que conduce a una terminación prematura de la traducción.
5. La secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el componente de la fusión altamente inmunogénico es el HbsAg o una parte inmunogénica del mismo.
- 25 6. La secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el VPH es VPH-16 o VPH-18.
7. La secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde las partes (a) y (b) comprenden la región codificante de la secuencia de ADN como se representa en las Figuras 1, 2, 3, o 4, incluyendo o no la etiqueta Flag.
- 30 8. La secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, que comprende la región codificante de la secuencia de ADN como se representa en la figura 5, incluyendo o no la etiqueta Flag.
- 35 9. Un vector de expresión que contenga la secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. El vector de expresión de la reivindicación 9, que es un plásmido o un virus recombinante.
- 40 11. El vector de expresión de la reivindicación 10, en donde el plásmido o el virus recombinante sea pIRES-Neo2, pTet-On, pHSVPUC, un amplicon del HSV o un vector del SFV.
12. Células huésped que contengan la secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
- 45 13. Una proteína de fusión de E6 o E7 que está codificada por la secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
14. Un método para producir una proteína de fusión de E6 o E7 según la reivindicación 13, que comprende el cultivo de las células huésped según la reivindicación 12 bajo condiciones adecuadas.
- 50 15. Composición farmacéutica que comprende una secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, proteínas de fusión de E6 o E7 según la reivindicación 13 o las proteínas de fusión de E6 o E7 producidas según el método de la reivindicación 14 con un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 55 16. Uso de una secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, de un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, de las proteínas de fusión de E6 o E7 según la reivindicación 13 o de las proteínas de fusión de E6 o E7 producidas según el método de la reivindicación 14 para la preparación de una vacuna para la prevención o tratamiento de una infección por VPH o una neoplasia asociada a una infección por VPH.
- 60 17. Uso de proteínas de fusión de E6 o E7 según la reivindicación 13 o producidas según el método de la reivindicación 14 para la producción *in vitro* de anticuerpos policlonales o monoclonales.
- 65 18. Uso de proteínas de fusión de E6 o E7 según la reivindicación 13 o producidas según el método de la reivindicación 14 en un ensayo *in vitro* para la detección de anticuerpos específicos o linfocitos T citotóxicos en una muestra obtenida de un sujeto infectado por VPH.

ES 2 284 559 T3

19. Uso de una línea de ratones transgénicos transformada con una secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para probar vacunas contra el VPH *in vitro*.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1

CAAGCTTGCTAGC

ATG	<u>CAC</u>	<u>CAC</u>	<u>CAC</u>	<u>CAC</u>	<u>CAC</u>	<u>CAC</u>	GGC	GAC	ACC	CCC	ACC	TTG	CAC	GAG
M	H	H	H	H	H	H	G	D	T	P	T	L	H	E
TAC	ATG	TTG	GAC	TTG	CAG	CCC	GAG	ACC	ACC	GAC	CTG	TAC	TGC	TAC
Y	M	L	D	L	Q	P	E	T	T	D	L	Y	C	Y
GAG	CAG	TTG	AAC	GAC	AGC	TCC	GAG	GAG	GAG	GAC	GAG	ATC	GAC	GGC
E	Q	L	N	D	S	S	E	E	E	D	E	I	D	G
CCC	GCC	GGC	CAG	GCC	GAG	CCC	GAC	CGC	GCC	CAC	TAC	AAC	ATC	GTG
P	A	G	Q	A	E	P	D	R	A	H	Y	N	I	V
ACC	TTG	TGC	TGC	AAG	TGC	GAC	TCC	ACC	CTG	CGC	CTG	TGC	GTG	CAG
T	F	C	C	K	C	D	S	T	L	R	L	C	V	Q
AGC	ACC	CAC	GTG	GAC	ATC	CGC	ACC	TTG	GAG	GAC	CTG	CTG	ATG	GGC
S	T	H	V	D	I	R	T	L	E	D	L	L	M	G
ACC	CTG	GGC	ATC	GTG	TGC	CCC	ATC	TGC	AGC	CAG	AAG	CCC	<u>GAC</u>	<u>TAC</u>
T	L	G	I	V	C	P	I	C	S	Q	K	P	D	Y
<u>AAG</u>	<u>GAC</u>	<u>GAC</u>	<u>GAC</u>	<u>GAC</u>	<u>AAG</u>	TAA	GAATTCGGATCCG							
K	D	D	D	D	K	*								

Fig.2

CAAGCTTGCTAGC

ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAG AAG CGC ACC GCC ATG TTC CAG
M H H H H H H Q K R T A M F Q

GAC CCC CAG GAG CGC CCC CGC AAG CTG CCC CAG CTG TGC ACC GAG
D P Q E R P R K L P Q L C T E

CTG CAG ACC ACC ATC CAC GAC ATC ATC CTG GAG TGC GTG TAC TGC
L Q T T I H D I I L E C V Y C

AAG CAG CAG CTG CTG CGC CGC GAG GTG TAC GAC TTC GCC TTC CGC
K Q Q L L R R E V Y D F A F R

GAC CTG TGC ATC GTG TAC CGC GAC GGC AAC CCC TAC GCC GTG TGC
D L C I V Y R D G N P Y A V C

GAC AAG TGC CTG AAG TTC TAC TCC AAG ATC AGC GAG TAC CGC CAC
D K C L K F Y S K I S E Y R H

TAC TGC TAC AGC CTG TAC GGC ACC ACC CTG GAG CAG CAG TAC AAC
Y C Y S L Y G T T L E Q Q Y N

AAG CCC CTG TGC GAC CTG CTG ATC CGC TGC ATC AAC TGC CAG AAG
K P L C D L L I R C I N C Q K

CCC CTG TGC CCC GAG GAG AAG CAG CGC CAC CTG GAC AAG AAG CAG
P L C P E E K Q R H L D K K Q

CGC TTC CAC AAC ATC AGG GGC CGG TGG ACC GGG CGC TGC ATG TCC
R F H N I R G R W T G R C M S

TGC TGC CGC TCC TCC CGC ACC CGC CGC GAG ACC CAG CTG GAC TAC
C C R S S R T R R E T Q L D Y

AAG GAC GAC GAC GAC AAG TAA GAATTCGGATCCG
K D D D D K *

Fig. 3

CAAGCTTGCTAGC

ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGC CCC AAG GCC ACC CTG CAG GAC
 M H H H H H H G P K A T L Q D

ATC GTG CTG CAC CTG GAG CCC CAG AAC GAG ATC CCC GTG GAC CTG
 I V L H L E P Q N E I P V D L

CTG TGC CAC GAG CAG CTG AGC GAC TCC GAG GAG GAG AAC GAC GAG
 L C H E Q L S D S E E E N D E

ATC GAC GGC GTG AAC CAC CAG CAC CTG CCC GCC CGC CGG GCC GAG
 I D G V N H Q H L P A R R A E

CCC CAG CGC CAC ACC ATG CTG TGC ATG TGC TGC AAG TGC GAG GCC
 P Q R H T M L C M C C K C E A

CGC ATC GAG CTG GTG GTG GAG AGC TCC GCC GAC GAC CTG CGC GCC
 R I E L V V E S S A D D L R A

TTC CAG CAG CTG TTC CTG AAC ACC CTG TCC TTC GTG TGC CCC TGG
 F Q Q L F L N T L S F V C P W

TGC GCC TCC CAG CAG GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG TAA
 C A S Q Q D Y K D D D D K *

GAATTCGGATCCG

Fig. 4

CAAGCTTGCTAGC

ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GCC CGC TTC GAG GAC CCC ACC CGC
 M H H H H H H A R F E D P T R

CGC CCC TAC AAG CTG CCC GAC CTG TGC ACC GAG CTG AAC ACC TCC
 R P Y K L P D L C T E L N T S

CTG CAG GAC ATC GAG ATC ACC TGC GTG TAC TGC AAG ACC GTG CTG
 L Q D I E I T C V Y C K T V L

GAG CTG ACC GAG GTG TTC GAG TTC GCC TTC AAG GAC CTG TTC GTG
 E L T E V F E F A F K D L F V

GTG TAC CGC GAC AGC ATC CCC CAC GCC GCC TGC CAC AAG TGC ATC
 V Y R D S I P H A A C H K C I

GAC TTC TAC AGC CGC ATC CGC GAG CTG CGC CAC TAC TCC GAC TCC
 D F Y S R I R E L R H Y S D S

GTG TAC GGC GAC ACC CTG GAG AAG CTG ACC AAC ACC GGC CTG TAC
 V Y G D T L E K L T N T G L Y

AAC CTG CTG ATC CGC TGC CTG CGC TGC CAG AAG CCC CTG AAC CCC
 N L L I R C L R C Q K P L N P

GCC GAG AAG CTG CGC CAC CTG AAC GAG AAG CGC CGC TTC CAC AAC
 A E K L R H L N H K R R F H N

ATC GCC GGC CAC TAC CGC GGC CAG TGC CAC TCC TGC TGC AAC CGC
 I A G H Y R G Q C H S C C N R

GCC CGC CAG GAG CGC CTG CAG CGC CGC CGC GAG ACC CAG GTG GAC
 A R Q E R L Q R R R E T Q V D

TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG TAA GAATTCGGATCCG
 Y K D D D D K *

Fig. 5

```

5' CTCGAGGATTGGGGACCCTGCGCTGAAC      ATG GAG AAC
                                           M  E  N

ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTT CTC GTG TTA CAG GCG GGG
I  T  S  G  F  L  G  P  L  L  V  L  Q  A  G

TPT TTC TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC
F  F  L  L  T  R  I  L  T  I  P  Q  S  L  D

TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TPT CTA GGG GGA ACT ACC GTG TGT
S  W  W  T  S  L  N  F  L  G  G  T  T  V  C

CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC TCA CCA ACC
L  G  Q  N  S  Q  S  P  T  S  N  H  S  P  T

TCT TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG
S  C  P  P  T  C  P  G  Y  R  W  M  C  L  R

CGT TTT ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC
R  F  I  I  F  L  F  I  L  L  L  C  L  I  F

TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAT CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT
L  L  V  L  L  D  Y  Q  G  M  L  P  V  C  P

CTA ATT CCA GGA TCC TCA ACA ACC AGC ACG GGA CCA TGC CGG ACC
L  I  P  G  S  S  T  T  S  T  G  P  C  R  T

TGC ATG ACT ACT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC TGT TGC
C  M  T  T  A  Q  T  T  S  M  Y  P  S  C  C

TGT ACC AAA CCT TCG GAC GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA
C  T  K  P  S  D  G  N  C  T  C  I  P  I  P

TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC
S  S  W  A  F  G  K  F  L  W  E  W  A  S  A

```

Fig. 5 continuación

CGT TTC TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT CAG TGG TTC
R F S W L S L L V P F V Q W F

GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG
V G L S P T V W L S V I W M M

TGG TAT TGG GGG CCA AGT CTG TAC AGC ATC TTG AGT CCC TTT TTA
W Y W G P S L Y S I L S P F L

CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT TGT CTT TGG GTA TAC ATT GAT ATC
P L L P I F F C L W V Y I D I

...

ATG CAC GGC GAC ACC CCC ACC TTG CAC GAG TAC ATG TTG GAC TTG
M H G D T P T L H E Y M L D L

CAG CCC GAG ACC ACC GAC CTG TAC TGC TAC GAG CAG TTG AAC GAC
Q P E T T D L Y C Y E Q L N D

AGC TCC GAG GAG GAG GAC GAG ATC GAC GGC CCC GCC GGC CAG GCC
S S E E E D E I D G P A G Q A

GAG CCC GAC CGC GCC CAC TAC AAC ATC GTG ACC TTC TGC TGC AAG
E P D R A H Y N I V T F C C K

TGC GAC TCC ACC CTG CGC CTG TGC GTG CAG AGC ACC CAC GTG GAC
C D S T L R L C V Q S T H V D

ATC CGC ACC TTG GAG GAC CTG CTG ATG GGC ACC CTG GGC ATC GTG
I R T L E D L L M G T L G I V

TGC CCC ATC TGC AGC CAG AAG CCC GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC
C P I C S Q K P D Y K D D D D

AAG TAA GAATTCGGATCCG 3'
K *

Fig. 6

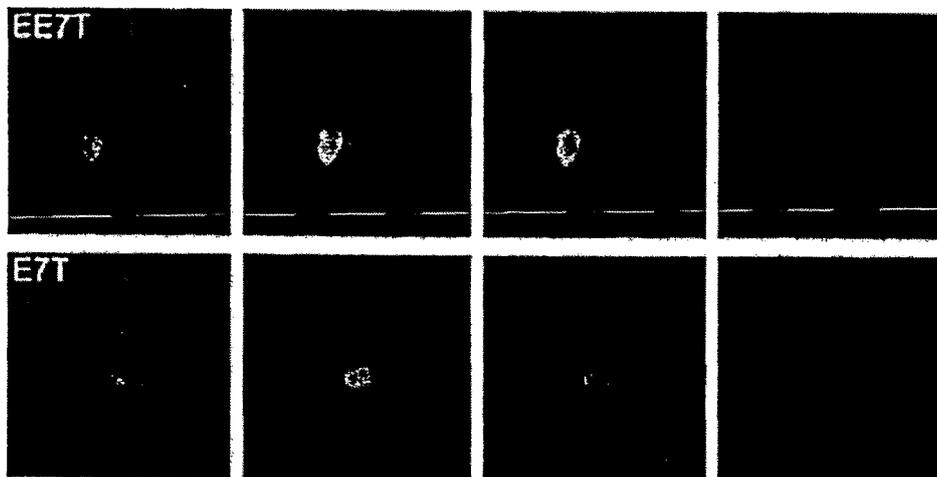
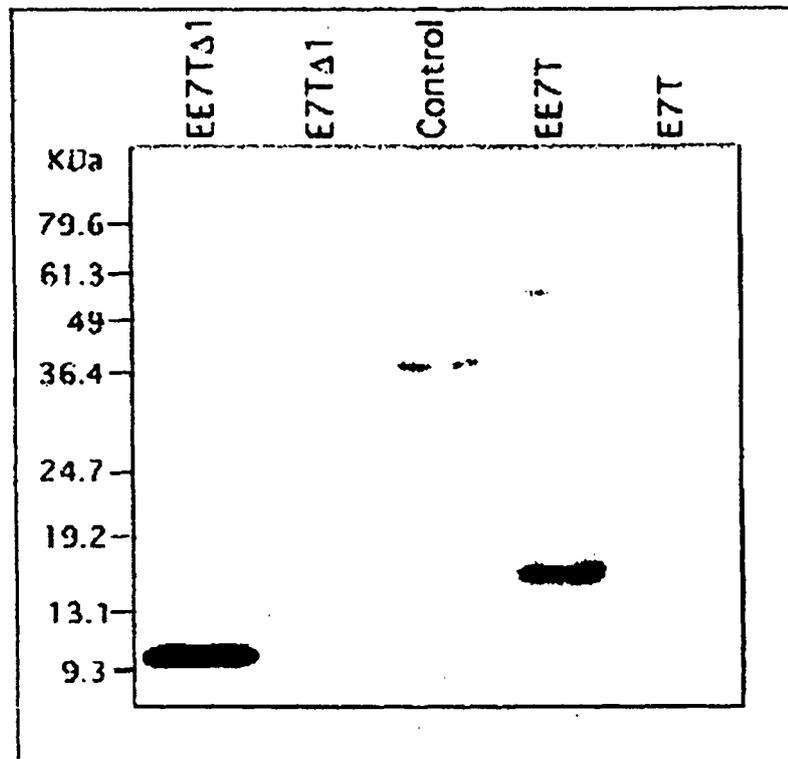


Fig.7



ES 2 284 559 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Deutsches Krebsforschungszentrum
- 5 <120> Genes y proteínas modificados E6 y E7 del VPH útiles para vacunación
- <130> K 2939
- <140> EP 01107271.7
- <141> 2001-03-23
- 10 <160> 25
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 542
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Gen E6 mutagenizado del VPH-16
- <220>
- <221> CDS
- <222> (14)...(526)
- 25 <400> 1

```

30      caagcttgct agc atg cac cac cac cac cac cac cag aag cgc acc gcc      49
           Met His His His His His His His Gln Lys Arg Thr Ala
                1                5                10

35      atg ttc cag gac ccc cag gag cgc ccc cgc aag ctg ccc cag ctg tgc      97
           Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
                15                20                25

40      acc gag ctg cag acc acc atc cac gac atc atc ctg gag tgc gtg tac      145
           Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
                30                35                40

45      tgc aag cag cag ctg ctg cgc cgc gag gtg tac gac ttc gcc ttc cgc      193
           Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
                45                50                55                60

50      gac ctg tgc atc gtg tac cgc gac ggc aac ccc tac gcc gtg tgc gac      241
           Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
                65                70                75

55      aag tgc ctg aag ttc tac tcc aag atc agc gag tac cgc cac tac tgc      289
           Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
                80                85                90

```

55

60

65

ES 2 284 559 T3

Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp
 130 135 140

5 Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu
 145 150 155 160

Thr Gln Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 165 170

10

<210> 3

<211> 362

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Gen E7 mutagenizado del VPH-16

<220>

20

<221> CDS

<222> (14)...(346)

25

<400> 3

caagcttgct agc atg cac cac cac cac cac ggc gac acc ccc acc 49
 Met His His His His His His Gly Asp Thr Pro Thr
 1 5 10

30

ttg cac gag tac atg ttg gac ttg cag ccc gag acc acc gac ctg tac 97
 Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr
 15 20 25

35

tgc tac gag cag ttg aac gac agc tcc gag gag gag gac gag atc gac 145
 Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp
 30 35 40

40

ggc ccc gcc ggc cag gcc gag ccc gac cgc gcc cac tac aac atc gtg 193
 Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val
 45 50 55 60

45

acc ttc tgc tgc aag tgc gac tcc acc ctg cgc ctg tgc gtg cag agc 241
 Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser
 65 70 75

50

acc cac gtg gac atc cgc acc ttg gag gac ctg ctg atg ggc acc ctg 289
 Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu
 80 85 90

55

ggc atc gtg tgc ccc atc tgc agc cag aag ccc gac tac aag gac gac 337
 Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
 95 100 105

gac gac aag taagaattcg gatccg 362
 Asp Asp Lys
 110

<210> 4

60

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> Descripción de la secuencia artificial: Gen E7 mutagenizado del VPH-16

ES 2 284 559 T3

<400> 4

5 Met His His His His His His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr
 1 5 10 15
 Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln
 20 25 30
 10 Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly
 35 40 45
 Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
 50 55 60
 15 Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp
 65 70 75 80
 20 Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys
 85 90 95
 Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 100 105 110
 25

<210> 5

<211> 545

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Gen E6 mutagenizado del VPH-18

<220>

<221> CDS

<222> (14)...(529)

40 <400> 5

45 caagcttgct agc atg cac cac cac cac cac gcc cgc ttc gag gac 49
 Met His His His His His His His Ala Arg Phe Glu Asp
 1 5 10
 50 ccc acc cgc cgc ccc tac aag ctg ccc gac ctg tgc acc gag ctg aac 97
 Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr Glu Leu Asn
 15 20 25
 55
 60
 65

ES 2 284 559 T3

```

acc tcc ctg cag gac atc gag atc acc tgc gtg tac tgc aag acc gtg 145
Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys Lys Thr Val
      30                35                40

5   ctg gag ctg acc gag gtg ttc gag ttc gcc ttc aag gac ctg ttc gtg 193
Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala Phe Lys Asp Leu Phe Val
      45                50                55

10  gtg tac cgc gac agc atc ccc cac gcc gcc tgc cac aag tgc atc gac 241
Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala Cys His Lys Cys Ile Asp
                65                70                75

15  ttc tac agc cgc atc cgc gag ctg cgc cac tac tcc gac tcc gtg tac 289
Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr
                80                85                90

20  ggc gac acc ctg gag aag ctg acc aac acc gcc ctg tac aac ctg ctg 337
Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu
                95                100               105

25  atc cgc tgc ctg cgc tgc cag aag ccc ctg aac ccc gcc gag aag ctg 385
Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala Glu Lys Leu
      110                115                120

30  cgc cac ctg aac gag aag cgc cgc ttc cac aac atc gcc ggc cac tac 433
Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr
      125                130                135

35  cgc ggc cag tgc cac tcc tgc tgc aac cgc gcc cgc cag gag cgc ctg 481
Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu
                145                150                155

40  cag cgc cgc cgc gag acc cag gtg gac tac aag gac gac gac gac aag 529
Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
                160                165                170

45  taagaattcg gatccg 545

```

```

40 <210> 6
    <211> 172
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
45 <220>
    <223> Descripción de la secuencia artificial: Gen E6 mutagenizado del VPH-18

```

50

55

60

65

ES 2 284 559 T3

<400> 6

5 Met His His His His His His Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg
 1 5 10 15
 Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln
 20 25 30
 10 Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr
 35 40 45
 Glu Val Phe Glu Phe Ala Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp
 50 55 60
 15 Ser Ile Pro His Ala Ala Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg
 65 70 75 80
 20 Ile Arg Glu Leu Arg His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu
 85 90 95
 Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu
 100 105 110
 25 Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn
 115 120 125
 30 Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys
 130 135 140
 His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg
 145 150 155 160
 35 Glu Thr Gln Val Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 165 170

40 <210> 7

<211> 383

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Gen E7 mutagenizado del VPH-18

<220>

50 <221> CDS

<222> (14)...(367)

55

60

65

ES 2 284 559 T3

<400> 7

caagcttgct agc atg cac cac cac cac cac cac ggc ccc aag gcc acc 49
Met His His His His His His His Gly Pro Lys Ala Thr
1 5 10

5 ctg cag gac atc gtg ctg cac ctg gag ccc cag aac gag atc ccc gtg 97
Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val
15 20 25

10 gac ctg ctg tgc cac gag cag ctg agc gac tcc gag gag gag aac gac 145
Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp
30 35 40

15 gag atc gac ggc gtg aac cac cag cac ctg ccc gcc cgc cgg gcc gag 193
Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu
45 50 55 60

20 ccc cag cgc cac acc atg ctg tgc atg tgc tgc aag tgc gag gcc cgc 241
Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg
65 70 75

25 atc gag ctg gtg gtg gag agc tcc gcc gac gac ctg cgc gcc ttc cag 289
Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln
80 85 90

30 cag ctg ttc ctg aac acc ctg tcc ttc gtg tgc ccc tgg tgc gcc tcc 337
Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser
95 100 105

35 cag cag gac tac aag gac gac gac gac aag taagaattcg gatccg 383
Gln Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
110 115

<210> 8

<211> 118

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Gen E7 mutagenizado del VPH-18

<400> 8

Met His His His His His His His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile
1 5 10 15

45 Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys
20 25 30

50 His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly
35 40 45

55 Val Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His
50 55 60

60 Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val
65 70 75 80

65 Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu
85 90 95

70 Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

75 Lys Asp Asp Asp Asp Lys
115

<210> 9

<211> 1046

ES 2 284 559 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Proteína de fusión HbsAG-EE7T

<220>

<221> CDS

10 <222> (29)...(1030)

<400> 9

```

ctcgaggatt ggggaccctg cgctgaac atg gag aac atc aca tca gga ttc      52
                               Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe
                               1                               5

cta gga ccc ctt ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg aca aga      100
Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg
   10                               15                               20

atc ctc aca ata ccg cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct ctc aat      148
Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn
   25                               30                               35                               40

ttt cta ggg gga act acc gtg tgt ctt ggc caa aat tcg cag tcc cca      196
Phe Leu Gly Gly Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro
   45                               50                               55

acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca act tgt cct ggt tat      244
Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr
   60                               65                               70

cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc atc ttc ctc ttc atc ctg ctg      292
Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu
   75                               80                               85

cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tat caa ggt atg ttg      340
Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu
   90                               95                               100

ccc gtt tgt cct cta att cca gga tcc tca aca acc agc acg gga cca      388
Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro
  105                               110                               115                               120

tgc cgg acc tgc atg act act gct caa gga acc tct atg tat ccc tcc      436
Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser
  125                               130                               135

tgt tgc tgt acc aaa cct tcg gac gga aat tgc acc tgt att ccc atc      484
Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile
  140                               145                               150

cca tca tcc tgg gct ttc gga aaa ttc cta tgg gag tgg gcc tca gcc      532
Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala
  155                               160                               165

cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta      580
Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val
  170                               175                               180

ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg tgg tat      628
Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr
  185                               190                               195                               200

tgg ggg cca agt ctg tac agc atc ttg agt ccc ttt tta ccg ctg tta      676
Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu
  205                               210                               215

```


ES 2 284 559 T3

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
 100 105 110
 5 Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
 115 120 125
 10 Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
 130 135 140
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
 145 150 155 160
 15 Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
 165 170 175
 20 Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
 180 185 190
 Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
 195 200 205
 25 Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
 210 215 220
 Tyr Ile Asp Ile Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met
 225 230 235 240
 30 Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu
 245 250 255
 35 Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln
 260 265 270
 40 Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys
 275 280 285
 Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile
 290 295 300
 45 Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro
 305 310 315 320
 50 Ile Cys Ser Gln Lys Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 325 330

<210> 11

<211> 98

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 11

65 ggatccaagc ttgccgtgat catgcacggc gacaccccca ccttgcacga gtacatgttg 60
 gacttgcagc ccgagaccac cgacctgtac tgctacga 98

<210> 12

ES 2 284 559 T3

<211> 79

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 12

10

```
gtagtgggcg cggtcgggct cggcctggcc ggcggggceg tcgatctcgt cctcctcctc 60  
ggagctgtcg ttcaactgc 79
```

15 <210> 13

<211> 78

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

25 <400> 13

```
gcccgaccgc gccactaca acatcgtgac cttctgctgc aagtgcgact ccaccctgcg 60  
cctgtgctg cagagcac 78
```

30

<210> 14

<211> 95

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

40 <400> 14

```
cccggggaat tccttagggc ttctggctgc agatggggca cacgatgcc agggtgccca 60  
tcagcaggtc ctccaaggcg cggatgtcca cgtgg 95
```

45

<210> 15

<211> 38

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

55 <400> 15

```
gacctgtact gctacgagca gttgaacgac agctccga
```

38

60 <210> 16

<211> 34

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

ES 2 284 559 T3

<400> 16
aggtgcggat gtccacgtgg gtgctctgca cgca 34

5 <210> 17
<211> 60
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

15 <400> 17
caagcttgct agcatgcacc accaccacca ccacggcgac acccccact tgcacgagta 60

20 <210> 18
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

30 <400> 18
caagcttgct agcatgcacc accaccacca ccacgacgag atcgacggcc ccgccggcca 60

35 <210> 19
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 19
45 **cggatccgaa ttcttacttg tcgctcgtct ccttgtagtc gggcttctgg ctgcagatgg 60**
ggcaca 66

<210> 20
50 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
55 <223> Descripción de la secuencia artificial: Marcador Hexa-His

<400> 20
60 His His His His His His
1 5

<210> 21
65 <211> 8
<212> PRT

