

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 964**

51 Int. Cl.:
C12N 15/37 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04757990 .9**
96 Fecha de presentación: **19.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1608767**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Expresión optimizada de L1 de VPH 31 en levadura**

30 Prioridad:
24.03.2003 US 457172 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
MERCK SHARP & DOHME CORP.
126 EAST LINCOLN AVENUE
RAHWAY, NJ 07065, US

72 Inventor/es:
JANSEN, Kathrin, U.;
SCHULTZ, Loren, D.;
NEEPER, Michael, P. y
MARKUS, Henry, Z.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 381 964 T3

DESCRIPCIÓN

Expresión optimizada de L1 de VPH 31 en levadura.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a la terapia de virus del papiloma humano (VPH). Más específicamente, la presente invención se refiere a polinucleótidos sintéticos que codifican la proteína L1 de VPH31, y a vectores recombinantes y huéspedes que comprenden dichos polinucleótidos. La presente invención también se refiere a partículas de tipo virus VPH31 (VLP) y a su uso en vacunas y composiciones farmacéuticas para prevenir y tratar VPH.

Antecedentes de la invención

10 Hay más de 80 tipos de virus del papiloma humano (VPH), muchos de los cuales se han asociado con una amplia diversidad de fenotipos biológicos, de verrugas proliferativas benignas a carcinomas malignos (para una revisión, véase McMurray y col., Int. J. Exp. Pathol. 82(1): 15-33 (2001)). VPH6 y VPH11 son los tipos más habitualmente asociados con verrugas benignas, condiloma acuminata no maligno y/o displasia de grado bajo de la mucosa genital o respiratoria. VPH16 y VPH18 son los tipos de alto riesgo más frecuentemente asociados con carcinomas *in situ* e
15 invasivos del cuello uterino, vagina, vulva y conducto anal. Más del 90 % de carcinomas cervicales se asocian con infecciones de VPH16, VPH18 o los tipos oncogénicos menos prevalentes VPH31, 33, 45, 52 y 58 (Schiffman y col., J. Natl. Cancer Inst. 85(12): 958-64 (1993)). La observación de que el ADN de VPH se detecta en 90-100 % de cánceres cervicales proporciona fuertes pruebas epidemiológicas de que VPH provoca carcinoma cervical (véase Bosch y col., J. Clin. Pathol. 55: 244-265 (2002)).

20 Los virus del papiloma son virus de ADN icosaédricos, con envoltura, pequeños (50-60 nm), que codifican hasta ocho genes tempranos y dos tardíos. Las fases abiertas de lectura (ORF) de los genomas virales se designan E1 a E7 y L1 y L2, en las que "E" indica temprano y "L" indica tardío. L1 y L2 codifican proteínas de la cápsida del virus, mientras que los genes E están asociados con funciones tales como replicación viral y transformación celular.

25 La proteína L1 es la proteína de cápsida principal y tiene un peso molecular de 55-60 kDa. La proteína L2 es una proteína de cápsida menor. Los datos inmunológicos sugieren que la mayor parte de la proteína L2 es interna a la proteína L1. Tanto la proteína L1 como la L2 están altamente conservadas entre diferentes virus del papiloma.

La expresión de la proteína L1 o una combinación de las proteínas L1 y L2 en levadura, células de insecto, células de mamífero o bacterias conduce a autoensamblaje de las partículas de tipo viral (VLP) (para una revisión, véase Schiller y Roden, en Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses; Lacey, ed. Leeds, UK: Leeds
30 Medical Information, págs. 101-12 (1996)). Las VLP son morfológicamente similares a viriones auténticos y son capaces de inducir altas titulaciones de anticuerpos neutralizadores tras su administración a un animal o un ser humano. Debido a que las VLP no contienen el genoma viral potencialmente oncogénico, presentan una alternativa segura al uso de virus vivo en desarrollo de vacuna de VPH (para una revisión, véase Schiller y Hidesheim, J. Clin. Virol. 19: 67-74 (2000)). Por esta razón, los genes L1 y L2 se han identificado como dianas inmunológicas para el
35 desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas para infección por VPH y enfermedad.

El desarrollo y la comercialización de vacuna de VPH se han visto obstaculizados por dificultades asociadas con la obtención de altos niveles de expresión de proteínas de la cápsida en organismos huésped transformados de forma exitosa, limitando la producción de proteína purificada. Por lo tanto, a pesar de la identificación de secuencias de nucleótidos de tipo silvestre que codifican proteínas L1 de VPH tales como proteínas L1 de VPH31 (Goldsborough y
40 col., Virology 171(1): 306-311 (1989)), sería altamente deseable desarrollar una fuente fácilmente renovable de proteínas VPH en bruto que utilice secuencias de nucleótidos que codifican L1 de VPH31 que estén optimizadas para expresión en la célula huésped pretendida. Adicionalmente, sería útil producir grandes cantidades de VLP de L1 de VPH31 que tuvieran las propiedades de conferir inmunidad de las proteínas nativas para su uso en el desarrollo de vacuna.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que inducen o potencian inmunidad a los productos proteicos expresados por genes L1 de VPH31, que se han asociado con cáncer cervical. Específicamente, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican proteína L1 de VPH31, como se define en la reivindicación 1,
50 estando dichos polinucleótidos sin señales de terminación de la transcripción internas que se reconocen por levadura, y habiéndose optimizado los codones de los polinucleótidos para expresión de nivel alto en una célula de levadura. La presente invención proporciona adicionalmente procedimientos para producir partículas de tipo viral (VLP) de VPH31 y desvela el uso de dichas VLP en composiciones inmunogénicas y vacunas para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad por VPH o cáncer asociado con VPH.

55 La presente invención se refiere a moléculas de ADN sintético que codifican la proteína L1 de VPH31. En la invención, la secuencia de nucleótidos de la molécula sintética se altera para eliminar señales de terminación de la transcripción que se reconocen por levadura, y los codones de las moléculas sintéticas se diseñan para usar los

codones preferidos por una célula de levadura. Las moléculas sintéticas pueden usarse como una fuente de proteína L1 de VPH31, que puede autoensamblarse en VLP. Dichas VLP pueden usarse en una vacuna basada en VLP.

La presente invención comprende una molécula de ácido nucleico sintética que codifica la proteína L1 de VPH31 como se expone en SEC ID N°: 4, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3.

También se proporcionan vectores recombinantes y células huésped recombinantes, tanto procariotas como eucariotas, que contienen las moléculas de ácido nucleico desveladas a lo largo de la presente memoria descriptiva.

La invención también se refiere a procedimientos para producir VLP de VPH31, y procedimientos para usar VLP de VPH31.

En una realización preferida de la invención, las VLP de VPH31 se producen en levadura. En una realización preferida adicional, la levadura se selecciona del grupo que consiste en: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluveromyces lactis*, y *Schizosaccharomyces pombe*.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, y “el” incluyen la referencia plural a no ser que el contexto claramente indique otra cosa.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, se aplican las siguientes definiciones y abreviaturas:

El término “promotor” se refiere a un sitio de reconocimiento en una cadena de ADN a la que se une la ARN polimerasa. El promotor forma un complejo de inicio con ARN polimerasa para iniciar y dirigir la actividad transcripcional. El complejo puede modificarse activando secuencias denominadas “potenciadores” o “secuencias activadoras cadena arriba” o inhibiendo secuencias denominadas “silenciadores”.

El término “vector” se refiere a algún medio por el que pueden introducirse fragmentos de ADN en un organismo huésped o tejido huésped. Existen diversos tipos de vectores incluyendo plásmido, virus (incluyendo adenovirus), bacteriófagos y cósmidos.

La designación “secuencia de tipo silvestre L1 31” se refiere a la secuencia L1 de VPH31 desvelada en el presente documento como SEC ID N°: 1. Aunque la secuencia de tipo silvestre L1 de VPH31 se ha descrito previamente, no es extraño encontrar variaciones de secuencia menores entre ADN obtenidos de aislados clínicos. Por lo tanto, se aisló una secuencia de tipo silvestre de L1 de VPH31 representativa de muestras clínicas que previamente se ha mostrado que contenían ADN de VPH31 (véase EJEMPLO 1). La secuencia de tipo silvestre L1 31 se usó como una secuencia de referencia para comparar las secuencias de L1 de VPH31 con codones optimizados desveladas en el presente documento (véase FIGURA 1).

La designación “reconstrucción parcial de L1 31” se refiere a una construcción, desvelada en el presente documento (SEC ID N°: 2), en la que la secuencia de nucleótidos de L1 de VPH31 se reconstruyó parcialmente para contener codones preferidos por levadura para expresión óptima en levadura. La reconstrucción parcial L1 31 comprende alteraciones en la parte media de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre L1 de VPH31 (nucleótido 697-1249). La secuencia L1 de VPH31 también se reconstruyó con codones preferidos por levadura, que se denomina en el presente documento “reconstrucción total de L1 31” (SEC ID N°: 3).

La expresión “cantidad eficaz” significa que se introduce suficiente composición de vacuna para producir los niveles adecuados del polipéptido, de modo que resulte una respuesta inmune. Un experto en la materia reconoce que este nivel puede variar.

Una “sustitución de aminoácidos conservativa” se refiere al reemplazo de un resto aminoacídico por otro resto aminoacídico químicamente similar. Los ejemplos de tales sustituciones conservativas son: sustitución con un resto hidrófobo (isoleucina, leucina, valina o metionina) de otro; sustitución con un resto polar de otro resto polar de la misma carga (por ejemplo, lisina por arginina; ácido aspártico por ácido glutámico).

El término “mamífero” se refiere a cualquier mamífero, incluyendo un ser humano.

“VLP” o “VLPS” significa partícula de tipo viral o partículas de tipo viral.

“Sintético” significa que el gen L1 de VPH31 se ha modificado de modo que contenga una secuencia de nucleótidos que no es la misma que la secuencia de nucleótidos presente en el gen L1 de VPH31 de tipo silvestre de origen natural. Como se ha indicado anteriormente, se proporcionan en el presente documento moléculas sintéticas que comprenden una secuencia de nucleótidos que se alteran para eliminar señales de terminación de la transcripción reconocidas por levadura. También se proporcionan en el presente documento moléculas sintéticas que comprenden codones que se prefieren para expresión por células de levadura. Las moléculas sintéticas proporcionadas en el presente documento codifican las mismas secuencias de aminoácidos que el gen L1 de VPH31 de tipo silvestre.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es un alineamiento de secuencias que muestra nucleótidos que se alteraron en los genes L1 31 de reconstrucción parcial (SEC ID N°: 2) y total (SEC ID N°: 3) (Véase EJEMPLO 2). La secuencia de referencia es la secuencia de tipo silvestre de L1 31 (SEC ID N°: 1; véase EJEMPLO 1). Los nucleótidos de las secuencias de reconstrucción parcial y total de L1 31 que son idénticos a la secuencia de referencia se indican con puntos. Se indican los nucleótidos alterados en su localización correspondiente. El número de nucleótidos está contenido dentro de los paréntesis.

La FIGURA 2 muestra las secuencias de nucleótidos (SEC ID N°: 3) y aminoácidos (SEC ID N°: 4) de reconstrucción total de L1 31. El número de nucleótidos se indica a la izquierda.

La FIGURA 3 resume los cambios entre las tres construcciones de secuencia de L1 de VPH31, que se enumeran a la izquierda. La cuarta columna indica el porcentaje de identidad de nucleótidos entre la construcción indicada y la secuencia de tipo silvestre de L1 31 y la quinta columna indica la identidad de los aminoácidos. La última columna indica el número de nucleótidos que se alteró a secuencias de codones preferidos por levadura y la región en la que se realizaron las alteraciones.

La FIGURA 4 muestra una transferencia de Northern explorada específicamente con respecto a L1 de VPH31 con alta rigurosidad (véase EJEMPLO 4). Las flechas a la izquierda indican la posición de los transcritos truncados y de longitud completa de L1 de VPH31. Los carriles marcados "31 wt" son de la misma preparación de ARN de levadura que contiene las secuencias de tipo silvestre L1 31. El carril marcado "16" contiene ARN de VPH16, que no se reconoce por la sonda de L1 de VPH31 debido a las condiciones de alta rigurosidad. El carril marcado "Neg" es un extracto de levadura que no contiene secuencias codificantes de L1. Los carriles marcados "31 R" son de ARN de dos colonias aisladas separadas que expresan la secuencia de reconstrucción parcial de L1 31.

La FIGURA 5 muestra una parte de los datos de dos experimentos de radioinmunoensayo de captura (RIA) en cuentas por minuto (cpm)/mg de proteína total (véase EJEMPLO 7). Las cpm obtenidas en el RIA son un indicador relativo de VLP de L1 de VPH31. Los datos de RIA demuestran aumento de la expresión de VLP de L1 31 en extractos de proteína de levadura de secuencias génicas reconstruidas con codón preferido por levadura.

La FIGURA 6 muestra una muestra representativa de las VLP de L1 31 descritas en el presente documento, como se visualiza por microscopía electrónica de transmisión (véase EJEMPLO 8). La barra representa 100 nm.

Descripción detallada de la invención

La mayoría de carcinomas cervicales están asociados con infecciones de tipos oncogénicos específicos de virus del papiloma humano (VPH). La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para inducir o potenciar inmunidad a los productos proteicos expresados por genes de tipos de VPH oncogénicos. Específicamente, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican partículas de tipo viral (VLP) de VPH31 y L1 de VPH31 y desvela el uso de dichos polinucleótidos en VLP en composiciones inmunogénicas y vacunas para la prevención y/o tratamiento de cáncer asociado con VPH.

La secuencia de nucleótidos de L1 de VPH31 de tipo silvestre se ha notificado (Goldsborough y col., Virology 171(1): 306-311 (1989); N° de Acceso de Genbank J04353). La presente invención proporciona moléculas de ADN sintéticas que codifican la proteína L1 de VPH31. Las moléculas sintéticas de la presente invención comprenden una secuencia de nucleótidos en la que algunos de los nucleótidos se han alterado para eliminar las señales de terminación de la transcripción que se reconocen por levadura y los codones de las moléculas sintéticas se diseñan para usar los codones preferidos por una célula de levadura para expresión de alto nivel. Las moléculas sintéticas pueden usarse como fuente de proteína L1 de VPH31, que puede autoensamblarse en VLP. Dichas VLP pueden usarse en una vacuna basada en VLP para proporcionar inmunoprolaxis eficaz contra infección por virus del papiloma a través de anticuerpo neutralizador e inmunidad mediada por células. Tales vacunas basadas en VLP también son útiles para el tratamiento de infecciones por VPH ya establecidas.

La expresión de VLP de VPH en células de levadura ofrece las ventajas de ser rentable y adaptarse fácilmente a crecimiento a gran escala en fermentadores. Sin embargo, muchas proteínas L1 de VPH, incluyendo L1 de VPH31 (véase EJEMPLO 4), se expresan a niveles bajos en células de levadura. Se ha determinado de acuerdo con la presente invención que la expresión de nivel bajo de L1 de VPH31 se debe al truncamiento del transcrito de ARNm resultante de la presencia de señales de terminación de la transcripción que se reconocen por levadura. Alterando el ADN de L1 de VPH31 para eliminar cualquier secuencia potencial que se asemeje a sitios de terminación de la transcripción de levadura, es posible facilitar la transcripción de ARNm de longitud completa dando como resultado expresión proteica de L1 de VPH31 aumentada.

En consecuencia, en la presente invención, se han realizado alteraciones al ADN de L1 de VPH31 para eliminar cualquier secuencia potencial que se asemeje a señales de terminación de la transcripción de levadura. Estas alteraciones permiten la expresión del transcrito de VPH31 de longitud completa, a diferencia de un transcrito truncado (véase EJEMPLO 4), que mejora el rendimiento de expresión.

Como se ha observado anteriormente, los ADN sintéticos de la presente invención comprenden alteraciones de la secuencia de L1 de VPH31 de tipo silvestre que se realizaron para eliminar sitios de terminación de la transcripción reconocidos por levadura. Un experto en la materia reconocerá que pueden construirse moléculas de ADN adicionales que codifican la proteína L1 de VPH31, pero no contienen sitios de terminación de la transcripción de levadura. Se conocen bien en la materia técnicas para encontrar secuencias de terminación de la transcripción de levadura. La terminación de la transcripción y formación de extremo 3' de ARNm de levadura requiere la presencia de tres señales: (1) un elemento de eficacia tal como TATATA o secuencias relacionadas, que potencie la eficacia de elementos de posicionamiento localizados cadena abajo; (2) elemento o elementos de posicionamiento, que determinan la localización del sitio poli(A) y (3) el sitio de poliadenilación (habitualmente Py(A)_n).

La bibliografía científica está repleta de descripciones de secuencias que codifican señales de terminación de la transcripción de levadura. Véase, por ejemplo, Guo y Sherman, Trends Biochem. Sci. 21: 477-481 (1986); Guo y Sherman, Mol. Cell. Biol. 16(6): 2772-2776 (1996); Zaret y col, Cell 28:563-573 (1982); Henikoff y col, Cell 33: 607-614 (1983); Thalenfeld y col, J. Biol. Chem. 258(23): 14065-14068 (1983); Zaret y col, J. Mol. Biol. 176: 107-135 (1984); Heidmann y col, Mol. Cell Biol 14: 4633-4642 (1984); y Russo, Yeast 11: 447-453 (1985). Por lo tanto, un experto en la materia no tendría dificultad para determinar que secuencias evitar para construir un gen de L1 de VPH31 sintético que produzca un transcrito de ARN de longitud completa de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, están bien establecidos en la técnica ensayos y procedimientos para evaluar si una secuencia de terminación de la transcripción de levadura está presente dentro de la secuencia sintética, de modo que un experto habitual en la materia sería capaz de determinar si una secuencia de L1 de VPH31 construida comprende secuencias de terminación que necesitan eliminarse.

En la presente invención, las secuencias génicas de L1 de VPH31 se "optimizan" con respecto a alto nivel de expresión en un ambiente celular de levadura.

Un "tripleto" codónico de cuatro bases nucleotídicas posibles puede existir en más de 60 formas variantes. Debido a que estos codones proporcionan el mensaje para solamente 20 aminoácidos diferentes (así como inicio y terminación de la transcripción), algunos aminoácidos pueden codificarse por más de un codón, un fenómeno conocido como redundancia codónica. Por razones no completamente comprendidas, no están presentes de forma uniforme codones alternativos en el ADN endógeno de diferentes tipos de células. De hecho, parece existir una jerarquía natural variable o "preferencia" por ciertos codones en ciertos tipos de células. Por ejemplo, el aminoácido leucina se especifica por cualquiera de seis codones de ADN incluyendo CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, y TTG. Un análisis exhaustivo de frecuencias codónicas del genoma para microorganismos ha revelado que el ADN endógeno de *E. coli* contiene más habitualmente el codón que especifica leucina CTG, mientras que el ADN de levaduras y mohos mucilaginosos incluye más habitualmente un codón que especifica leucina TTA. A la vista de esta jerarquía, se cree en general que la probabilidad de obtener niveles altos de expresión de un polipéptido rico en leucina por un huésped *E. coli* dependerá en cierto grado de la frecuencia de uso codónico. Por ejemplo, es probable que un gen rico en codones TTA se exprese escasamente en *E. coli*, mientras que un gen rico en CTG probablemente se expresará en alto grado en este huésped. De forma similar, un codón preferido para expresión de un polipéptido rico en leucinas en células huésped de levadura sería TTA.

Las implicaciones de los fenómenos de preferencia codónica en técnicas de ADN recombinante son manifiestas y el fenómeno puede servir para explicar muchos fracasos anteriores para conseguir altos niveles de expresión de genes exógenos en organismos huésped transformados de forma exitosa, un codón menos "preferido" puede estar presente repetidas veces en el gen insertado y la maquinaria de la célula huésped para expresión puede no funcionar tan eficazmente. Este fenómeno sugiere que los genes sintéticos que se han diseñado para incluir los codones preferidos por una célula huésped proyectada promocionan una forma óptima de material genético ajeno para la práctica de técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un gen de L1 de VPH31 que tiene los codones optimizados para expresión en una célula de levadura. En una realización preferida de la presente invención, se ha descubierto que el uso de codones alternativos que codifican la misma secuencia proteica puede eliminar las restricciones en la expresión de proteínas L1 de VPH31 por células de levadura.

De acuerdo con la presente invención, los segmentos génicos de L1 de VPH31 se convirtieron a secuencias que tenían secuencias traducidas idénticas pero con uso codónico alternativo como se describe en Sharp y Cowe (Synonymous Codon Usage in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7: 657-678 (1991)), que se incorpora por la presente por referencia. La metodología consiste en general en identificar codones en la secuencia de tipo silvestre que no están asociados habitualmente con genes de levadura altamente expresados y reemplazarlos con codones óptimos para alta expresión de células de levadura. La nueva secuencia génica se inspecciona después con respecto a secuencias no deseadas generadas por estos reemplazos de codón (por ejemplo, secuencias "ATTTA", creación involuntaria de sitio de reconocimiento de corte y empalme de intrones, sitios de enzimas de restricción no deseados, etc.). Las secuencias no deseadas se eliminan por sustitución de los codones existentes con codones diferentes que codifican el mismo aminoácido. Los segmentos génicos sintéticos se ensayan después con respecto a expresión mejorada.

Los procedimientos descritos anteriormente se usaron para crear segmentos génicos sintéticos para L1 de VPH31, dando como resultado un gen que comprende codones optimizados para alto nivel de expresión. Aunque el

procedimiento anterior proporciona un resumen de la metodología de los inventores para diseñar genes con codones optimizados para su uso en vacunas de VPH, se entiende por un experto en la materia que pueden conseguirse eficacia de vacuna similar o aumento de la expresión de genes por variaciones menores en el procedimiento o por variaciones menores en la secuencia.

- 5 Un aspecto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico con codones optimizados que codifica la proteína L1 de VPH31 como se expone en SEC ID N°: 4, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 2.

- Otro aspecto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico con codones optimizados que codifica la proteína L1 de VPH31 como se expone en SEC ID N°: 4, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una
10 secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 3.

La presente invención también se refiere a vectores recombinantes y células huésped recombinantes, tanto procariontas como eucariotas, que contienen las moléculas de ácido nucleico desveladas a lo largo de la presente memoria descriptiva.

- 15 El ADN de VPH31 sintético o fragmentos del mismo contruidos a través de los procedimientos descritos en el presente documento pueden expresarse de forma recombinante por clonación molecular en un vector de expresión que contiene un promotor adecuado y otros elementos reguladores de la transcripción apropiados, y transferirse a células huésped procariontas o eucariotas para producir L1 de VPH31 recombinante. Se describen técnicas para tales manipulaciones en la materia (Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., Green Pub. Associates and Wiley-Interscience, Nueva York (1988); Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual, Rose y col., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1990), que se incorporan por la
20 presente por referencia en su totalidad).

- La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para expresar una proteína L1 de VPH31 en una célula huésped recombinante, que comprende: (a) introducir un vector que comprende un ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 en una célula huésped de levadura; y (b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína L1 de VPH31.
25

- Los genes sintéticos de la presente invención pueden ensamblarse en un casete de expresión que comprende secuencias diseñadas para proporcionar expresión eficaz de la proteína L1 de VPH31 en la célula huésped. El casete contiene preferentemente el gen sintético, con secuencias de control de la traducción y la transcripción relacionadas ligadas operativamente con él, tales como un promotor, y secuencias de terminación. En una realización preferida, el promotor es el promotor GAL1 de *S. cerevisiae*, aunque los expertos en la materia reconocerán que puede usarse cualquiera de varios otros promotores de levadura conocidos tales como los promotores *GAL10*, *GAL7*, *ADH1*, *TDH3* o *PGK*, u otros promotores génicos eucariotas. Un terminador de la transcripción preferido es el terminador *ADH1* de *S. cerevisiae*, aunque también pueden usarse otros terminadores de la transcripción conocidos. Se prefiere particularmente la combinación de promotor *GAL1* - terminador *ADH1*.
30
35

- Otro aspecto de la presente invención son procedimientos para producir VLP de VPH31 y procedimientos para usar VLP de VPH31. Las VLP pueden autoensamblarse cuando L1, la proteína de cápsida principal del virus del papiloma humano y animal, se expresa en levadura, células de insecto, células de mamífero o bacterias (para una revisión, véase Schiller y Roden, en Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses; Lacey, ed. Leeds, Reino Unido: Leeds Medical Information, pp 101-12 (1996)). También pueden producirse VLP de VPH morfológicamente indiferenciados por expresión de una combinación de las proteínas de cápsida L1 y L2. Las VLP están compuestas de 72 pentámeros de L1 en una estructura icosaédrica T=7 (Baker y col., Biophys. J. 60(6): 1445-56 (1991)).
40

- Las VLP son morfológicamente similares a viriones auténticos y son capaces de inducir altas titulaciones de anticuerpos de neutralización tras su administración a un animal. Se mostró que la inmunización de conejos (Breitburd y col., J. Virol. 69(6): 3959-63 (1995)) y perros (Suzich y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(25): 11553-57 (1995)) con VLP induce anticuerpos de neutralización así como protege contra infección por virus del papiloma experimental. Sin embargo, debido a que las VLP no contienen el genoma viral potencialmente oncogénico y pueden autoensamblarse a partir de un gen sencillo, presentan una alternativa segura al uso de virus vivo en desarrollo de vacuna de VPH (para una revisión, véase Schiller y Hidesheim, J. Clin. Virol. 19: 67-74 (2000)).
45

- En una realización preferida de la invención, las VLP de VPH31 se producen en levadura. En una realización preferida adicional, la levadura se selecciona del grupo que consiste en: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyvermyces fragilis*, *Kluveromyces lactis*, y *Schizosaccharomyces pombe*.
50

- Otro aspecto más de la presente invención es un procedimiento para producir VLP de VPH31, que comprende: (a) transformar levadura con una molécula de ADN recombinante que codifica proteína L1 de VPH31; (b) cultivar la levadura transformada en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ADN recombinante para producir la proteína de VPH31 recombinante; y (c) aislar la proteína de VPH31 recombinante para producir VLP de VPH31, en el que la molécula de ADN recombinante consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3.
55

La invención también se refiere a un procedimiento para preparar una vacuna que comprende partículas de tipo viral (VLP) de VPH31.

En una realización alternativa de este aspecto de la invención, la vacuna comprende adicionalmente VLP de al menos un tipo de VPH adicional. En una realización preferida, el al menos un tipo adicional de VPH se selecciona del grupo que consiste en: VPH6, VPH11, VPH 16, VPH 18, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH55, VPH56, VPH58, VPH59 y VPH68.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la vacuna comprende adicionalmente VLP de VPH 16.

En otra realización preferida de la invención, la vacuna comprende adicionalmente VLP de VPH16 y VLP de VPH18.

En otra realización preferida más de la invención, la vacuna comprende adicionalmente VLP de VPH6, VLP de VPH11, VLP de VPH16 y VLP de VPH18.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar composiciones farmacéuticas que comprenden partículas de tipo viral de VPH31. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden VLP de VPH31 y VLP de al menos un tipo de VPH adicional. En una realización preferida, el al menos un tipo de VPH adicional se selecciona del grupo que consiste en: VPH6, VPH11, VPH 16, VPH18, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH55, VPH56, VPH58, VPH59 y VPH68.

Las composiciones de vacuna preparadas usando la presente invención pueden usarse solas a dosificaciones apropiadas definidas por ensayos rutinarios para obtener inhibición óptima de infección por VPH31 minimizando a la vez cualquier toxicidad potencial. Además, puede ser deseable la coadministración o administración secuencial de otros agentes.

La cantidad de partículas de tipo viral para introducir en un receptor de vacuna dependerá de la inmunogenicidad del producto génico expresado. En general, se administra directamente en tejido muscular una dosis inmunológicamente o profilácticamente eficaz de aproximadamente 10 µg a 100 µg, y preferentemente de aproximadamente 20 µg a 60 µg de VLP. También se contemplan inyección subcutánea, introducción intradérmica, impresión a través de la piel y otros modos de administración tales como suministro intraperitoneal, intravenoso o por inhalación. También se contempla que puedan proporcionarse vacunaciones de refuerzo. También es ventajosa la administración parenteral, tal como intravenosa, intramuscular, subcutánea u otro medio de administración con adyuvantes tales como alumbre o adyuvante de alumbre de Merck, simultáneamente con o posterior a la introducción parenteral de la vacuna de la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran, pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Determinación de una secuencia de L1 de VPH31 representativa

La secuencia de tipo silvestre de L1 de VPH31 se ha descrito previamente (Goldsborough y col., Virology 171(1): 306-311 (1989); N° de Acceso de Genbank J04353). No es infrecuente, sin embargo, encontrar variaciones de secuencia menores entre ADN obtenidos de aislados clínicos. Para aislar una secuencia de tipo silvestre de L1 de VPH31 representativa, se aisló ADN de tres muestras clínicas que previamente se había mostrado que contenían ADN de VPH31. Se amplificaron secuencias de L1 de VPH31 en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ADN polimerasa *Taq* y los siguientes cebadores: HPV 31 L1 F 5' - CGT CGA CGT AAA CGT GTA TCA TAT TTT TTT ACA G - 3' (SEC ID N°: 5) y HPV 31 L1 B 5' - CAG ACA CAT GTA TTA CAT ACA CAA C - 3' (SEC ID N°: 6). Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Las bandas de L1 de ~1500 pb se escindieron y el ADN se purificó usando el kit de purificación de PCR QIA quick (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN se ligó después al vector de clonación TA, pCR-II (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), se transformaron *E. coli* y se sembraron en agar LB con ampicilina más IPTG y X-gal para selección de colonias azules/blancas. Las placas se invirtieron y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Las colonias blancas se cultivaron en medio LB con ampicilina, agitando a 37 °C durante 16 horas y se realizaron minipreps para extraer el ADN plasmídico.

Para demostrar la presencia del gen L1 en el plásmido, se realizaron digestiones con endonucleasas de restricción y se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Se realizó secuenciación de ADN en plásmidos que contenían L1 clonado de cada uno de tres aislados clínicos. Se compararon secuencias de ADN y aminoácidos traducidos entre sí y con las secuencias de L1 de VPH31 de Genbank. El análisis de secuencia de los tres aislados clínicos reveló que ninguna secuencia era idéntica a la secuencia de Genbank. El clon pCR-II-VPH31L1/81 se seleccionó para ser la secuencia de L1 31 representativa y se denomina en el presente documento "secuencia de tipo silvestre de L1 31" (SEC ID N°: 1, véase FIGURA 1). La secuencia seleccionada como tipo silvestre de L1 31 contenía una sustitución silenciosa en el nucleótido 1266 y un cambio de C a una G en el nucleótido 1295, alterando el aminoácido codificado de treonina a serina. Los genes de reconstrucción parcial y total de L1 31 (SEC ID N°: 2 y 3, respectivamente) también codifican una serina en esta localización (véase FIGURA 1). En todos los casos, las secuencias de aminoácidos son idénticas. Los nucleótidos se cambiaron en las

construcciones de reconstrucción para codificar aminoácidos usando secuencias codónicas preferidas por levadura y para eliminar señales de terminación de la transcripción potenciales (véase EJEMPLO 2).

La secuencia de tipo silvestre de L1 31 se amplificó usando los cebadores LS-101 5' - CTC AGA TCT CAC AAA ACA AAA TGT CTC TGT GGC GGC CTA GC - 3' (SEC ID N°: 7) y LS-102 5' - GAC AGA TCT TAC TTT TTA GTT TTT TTA CGT TTT GCT GG - 3' (SEC ID N°: 8) para añadir extensiones de *Bgl* II. Se realizó PCR usando ADN polimerasa *Vent*TM. El producto de PCR se visualizó por tinción con bromuro de etidio de un gel de agarosa. La banda de ~1500 pb se escindió y se purificó el ADN usando el kit de extracción en gel QIAEX II (Qiagen). El producto de PCR se digirió después con *Bgl* II a 37 °C durante 2 horas y se purificó usando el kit de purificación de PCR QIA quick. El producto de PCR de L1 31 digerido con *Bgl* II se ligó a pGAL110 digerido con *Bam*HI y se transformaron *E. coli* DH5. Las colonias se exploraron por PCR con respecto al inserto L1 de VPH31 en la orientación correcta. La secuencia y orientación se confirmaron por secuenciación de ADN. El clon seleccionado se nombró pGAL110-HPV31L1 N° 2.

Se preparó después ADN de maxiprep y se hicieron competentes y transformaron *Saccharomyces cerevisiae*. La transformación de levadura se sembró en agar de cobertura de sorbitol Leu⁻ en placas de sorbitol Leu⁻ y se incubó invertida durante 3-5 días a 30 °C. Las colonias se seleccionaron y se sembraron en estrías para aislamiento en placas de sorbitol Leu⁻. Para inducir transcripción de L1 y expresión proteica, las colonias aisladas se dejaron crecer posteriormente en 5 ml de sorbitol Leu⁻ Ade⁻ 5X con glucosa 1,6 % y galactosa 4 % en cultivos de tubos rotatorios a 30 °C.

Ejemplo 2

Optimización de codones para levadura

Se han descrito codones preferidos por levadura (Sharp y Cowe, *Yeast* 7: 657-678 (1991)). Inicialmente, la parte media de L1 de VPH31, que representa los nucleótidos 697-1249, se reconstruyó utilizando codones preferidos por levadura. La estrategia empleada para reconstruir fue diseñar oligómeros sentido y antisentido solapantes largos que abarcaban la región para reconstruir, sustituyendo nucleótidos con secuencias de codones preferidos por levadura manteniendo a la vez la misma secuencia de aminoácidos. Estos oligómeros se usaron en lugar de ADN molde en la reacción de PCR. Se diseñaron cebadores de amplificación adicionales y se usaron para amplificar las secuencias reconstruidas a partir de los oligómeros molde con ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA). Las condiciones óptimas para amplificación fueron específicas de sección; sin embargo, la mayoría emplearon un programa semejante al siguiente: una etapa de desnaturalización inicial de 94 °C durante 1 minuto, seguido de 15-25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 3,5 minutos, seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 minutos y mantenimiento a 4 °C.

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en gel de agarosa. Las bandas del tamaño apropiado se escindieron y el ADN se purificó en gel. Los fragmentos amplificados se usaron después como molde para ensamblar el fragmento de L1 medio de VPH31 reconstruido de 552 nucleótidos. Después se usó PCR para amplificar los nucleótidos de tipo silvestre 1-725 (extremo 5') y 1221-1515 (extremo 3'). Se realizó una PCR final usando el extremo 5', el extremo 3' y la parte media reconstruida para generar reconstrucción parcial de L1 31 de longitud completa, denominada en el presente documento "reconstrucción parcial de L1 31".

La secuencia de L1 31 completa también se reconstruyó con codones preferidos por levadura. Esta construcción se denomina en el presente documento "reconstrucción total de L1 31". Se usaron nueve oligómeros solapantes largos para generar secuencias de nucleótidos de codón preferido por levadura de 1-753 y se usaron cuatro oligómeros solapantes largos para generar secuencias de nucleótidos de codón preferido por levadura de 1207-1515. Después de amplificación y purificación en gel, estos fragmentos, junto con la sección reconstruida media descrita anteriormente (nucleótidos 697-1249), se usaron juntos en una reacción de PCR para generar la secuencia de reconstrucción total de L1 31 de longitud completa. Este trozo se generó con extensiones de *Bam*HI. El ADN de L1 31 reconstruido purificado en gel se digirió con *Bam*HI, se ligó con vector de expresión pGAL100 digerido con *Bam*HI y se transformó en células DH5 de *E. coli*. Se exploraron colonias por PCR con respecto al inserto L1 de VPH31 en la orientación correcta. La secuencia y orientación se confirmaron por secuenciación de ADN.

Se preparó ADN plasmídico. Las células de *S. cerevisiae* se hicieron competentes y se transformaron. La levadura se sembró en agar de cobertura de sorbitol Leu⁻ en placas de sorbitol Leu⁻ y se incubó invertida durante 3-5 días. Las colonias se sembraron en estrías para aislamiento en placas de sorbitol Leu⁻. Las colonias aisladas se dejaron crecer posteriormente en 5 ml de sorbitol Leu⁻ Ade⁻ 5X con glucosa 1,6 % y galactosa 4 % en cultivos de tubos rotatorios a 30 °C para inducir transcripción de L1 y expresión proteica. Después de 48-72 horas, se sedimentó el volumen de cultivo equivalente a una DO600 = 10, se retiró sobrenadante y los sedimentos se congelaron y almacenaron a -70 °C.

Ejemplo 3Preparación de ARN

Se descongelaron en hielo sedimentos celulares de levadura transformada, que se indujo que expresara L1 de VPH31 por inducción con galactosa y se suspendieron en 1 ml de agua tratada con DEPC frío. Las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante resultante se retiró. El sedimento celular se resuspendió después en 400 μ l de TES (Tris 10 mM pH 7,0, EDTA 10 mM y SDS 0,5 %). Se añadió un volumen igual de fenol saturado con tampón AE (NaOAc 50 mM y EDTA 10 mM). El tubo se agitó en vórtex durante 10 segundos y se calentó a 65 °C durante 55 minutos mezclando cada 10 minutos. El tubo se colocó después en hielo durante 5 minutos, seguido de centrifugación a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió y se transfirió a un tubo estéril. Se añadieron 400 μ l adicionales de fenol, el tubo se agitó en vórtex, se colocó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se añadieron 400 μ l de cloroformo, se mezclaron y se centrifugaron. El sobrenadante se recogió de nuevo y se transfirió a un tubo estéril y se añadieron 40 μ l de Na acetato 3 M pH 5,2 además de 1 ml de EtOH 100 %. El tubo se colocó en hielo seco durante una hora, después de lo cual se centrifugó a alta velocidad para sedimentar el ARN. El ARN se lavó una vez con EtOH 70 % y se secó al aire. El ARN se suspendió después en 100 μ l de agua tratada con DEPC y se calentó a 65 °C durante 5 minutos para disolver. Se realizó espectrofotometría para determinar la concentración de ARN en la muestra usando la suposición de que una lectura de A260 de 1 = 40 μ g/ml de ARN cuando la A260/280 es 1,7-2,0.

Ejemplo 4Análisis de transferencia de Northern

El análisis inicial de levadura que expresa tipo silvestre de L1 31 sugirió que el rendimiento de expresión de proteína L1 de VPH31 era considerablemente menos que el esperado. Para determinar si la expresión baja sucedía debido a un problema en el nivel de transcripción frente al nivel de traducción, se realizó análisis de transferencia de Northern del transcrito de L1 de VPH31. Se realizaron transferencias de Northern a partir de geles en los que se procesó ARN de levadura que expresaba L1 de VPH16 con ARN de levadura que expresaba L1 de VPH31 en el mismo gel para comparar los tamaños del transcrito.

Se moldeó un gel de formaldehído de agarosa 1,2 %. Se combinaron diez microgramos de ARN con tampón desnaturante (concentraciones finales: formaldehído 6 %, formamida 45 % y MOPS 0,9 x) y se calentaron a 55 °C durante 15 minutos. Se añadió un décimo de volumen del tampón de carga del gel y la muestra se cargó en el gel. Se realizó electroforesis a 65 voltios en tampón MOPS 1 x durante ~ 5 horas. El gel se lavó durante 15 minutos en agua estéril seguido de dos lavados de 15 minutos en SSC 10 x. El ARN se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por acción capilar durante 16 horas en SSC 10 x. El ARN se fijó después a la membrana de nylon reticulando usando el reticulador Amersham ajustado para 700 unidades de energía. Después de fijar, se permitió que la membrana de nylon se secara al aire. La membrana se situó en 30 ml de tampón Zetaprobe a 55 °C durante 2 horas después de lo cual se añadieron sondas marcadas con 32P y se incubaron durante 16 horas a 53-65 °C. La membrana se lavó después 3 veces en SSC 5 X a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguido de 2 veces en SSC 0,4 X durante 20 minutos a temperatura ambiente y una vez a 60 °C durante 10 minutos. Se generó ADN de sonda por PCR usando cebadores sentido y antisentido específicos de secuencia de L1 de VPH31. El ADN amplificado se marcó por tratamiento con polinucleótido quinasa (PNK) y ATP γ -32P a 37 °C durante 1 hora. La transferencia se envolvió en film plástico saran y se expuso a una película de rayos x durante 16 horas. Tras el revelado de la película, se detectó ARN hibridado con sonda como una banda negra en la autorradiografía.

El análisis de la transferencia de Northern descrito anteriormente reveló que la mayoría de los transcritos de tipo silvestre de L1 de VPH31 de longitud completa eran considerablemente más pequeños que la longitud completa (véase FIGURA 4). Sin embargo, la reconstrucción parcial de L1 31 se diseñó no solamente para insertar codones preferidos por levadura en la mitad del gen, sino también para eliminar cualquier secuencia potencial que se asemeje a los sitios de terminación de la transcripción de levadura. El análisis de transferencia de Northern claramente mostró que tras la reconstrucción, la longitud del transcrito del gen L1 31 había aumentado significativamente hasta un tamaño correspondiente al del transcrito de L1 de VPH16 de longitud completa (no mostrado). Por lo tanto, es probable que la terminación de la transcripción prematura explique una parte significativa del bajo rendimiento de expresión de la construcción de tipo silvestre de L1 31.

Ejemplo 5Expresión de proteína de L1 de VPH31

Se descongelaron en hielo sedimentos de células de levadura congelados de cultivos inducidos por galactosa equivalentes a DO600= 10 y se suspendieron en 300 μ l de tampón PC (Na2HPO4 100 mM y NaCl 0,5 M, pH 7,0) con PMSF 2 mM. Se añadieron perlas de vidrio de 0,5 mm lavadas con ácido, ~0,5 g/tubo. Los tubos se agitaron en vórtex durante 15 minutos a 4 °C. Se añadieron 7,5 μ l de Tritón X100 20 % y se repitió la agitación en vórtex durante 5 minutos a 4 °C. Los tubos se colocaron en hielo durante 15 minutos, después se centrifugaron durante 15 minutos

a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril y se almacenó a -70 °C.

Ejemplo 6

Análisis de transferencia de Western

Se analizó el extracto de proteína de levadura total de veinte a cuarenta colonias de levadura aisladas de cada construcción de L1 de VPH31 por transferencia de Western para confirmar la expresión de la proteína L1 de VPH31 después de inducción de galactosa.

Se combinaron diez microgramos de extracto de proteína de levadura total con tampón de carga de SDS-PAGE y se calentó a 95 °C durante 10 minutos. Las proteínas se cargaron en un gel de SDS-PAGE 8 % y se sometieron a electroforesis en tampón de Tris-Glicina. Después de la separación de proteínas, las proteínas se transfirieron por Western del gel a nitrocelulosa y la mancha de transferencia se bloqueó en leche en polvo desnatada 10 % en TTBS (solución salina tamponada con Tris con Tween-20) durante 16 horas. La transferencia se lavó tres veces en TTBS. Se aplicó suero de cabra anti-trpE-L1 de VPH16, un suero policlonal que reacciona de forma cruzada con L1 de VPH31, a una dilución 1:1000 en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La mancha de transferencia se lavó tres veces en TTBS y se aplicó anticuerpo conjugado anti-HRP de cabra a una dilución 1:2500 en TTBS durante 1 hora. La mancha de transferencia se lavó de nuevo tres veces y se aplicó reactivo de detección ECL™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Después se realizó una autorradiografía. Las proteínas reconocidas por el antisuero se visualizaron por el reactivo de detección como bandas oscuras en la autorradiografía.

En todos los casos, la proteína L1 de VPH31 se detectó como una banda definida en la autorradiografía correspondiente a aproximadamente 55 kD (datos no mostrados). La proteína L1 de VPH 16 se incluyó como un control positivo en los geles.

Ejemplo 7

Radioinmunoensayo (RIA)

Las células de levadura que expresaban L1 de VPH31 se cultivaron por una diversidad de procedimientos, incluyendo cultivos de tubos rotatorios, matraces agitadores y fermentadores. La levadura se lisó y se prepararon extractos proteicos para determinar la cantidad de partículas de tipo viral (VLP) de L1 de VPH31 producidas por miligramo de proteína total. Para demostrar la expresión de VLP de L1 de VPH31, se analizó una parte de cada extracto de proteína de levadura total por radioinmunoensayo de captura (RIA).

El RIA se realizó usando un anticuerpo monoclonal de detección, H31.A6, que es específico de VPH tipo 31 y específico conformacional de VLP. H31.A6 es específico de L1 de VPH tipo 31 puesto que se ha descubierto que se une a VLP de L1 de VPH31 intactas y no reconoce VLP de VPH31 desnaturalizadas. Este mAAb puede detectarse posteriormente por un anticuerpo de cabra anti ratón radiomarcado con 1125. Por lo tanto, los valores de cuentas por minuto (cpm) corresponden a niveles relativos de expresión de VLP de L1 de VPH31.

Se revistieron perlas de poliestireno con un suero policlonal de cabra anti-trpE-L1 de VPH31 diluido 1:1000 en PBS durante una noche. Las perlas se lavaron después con 5 volúmenes de agua destilada estéril y se secaron al aire. El antígeno, extracto de proteína de levadura total de colonias de levadura aisladas, se cargó después en las perlas por dilución en PBS con BSA 1 %, Tween-20 0,1 % y azida sódica 0,1 % y se incubó con rotación durante una hora. Después de lavar, las perlas se distribuyeron una por pocillo en una placa de poliestireno de 20 pocillos y se incubaron con mAAb H31.A6 diluido 1:50.000 durante 17-24 horas a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron y se añadió IgG anti ratón de cabra marcado con 1125 a un intervalo de actividad de 23000-27000 cpm por cada 10 µl. Después de 2 horas, las perlas se lavaron y se registraron las cuentas radiactivas en cpm/ml. Las cuentas de fondo de los pocillos blancos se restaron de cpm/ml total, proporcionando el RIA menos valor de fondo.

Se realizaron dos experimentos: en el experimento 1, se compararon extractos de proteína de L1 31 de tipo silvestre y reconstrucción parcial de L1 31 y en el experimento 2, se compararon extractos proteicos de reconstrucción parcial de L1 31 y reconstrucción total de L1 31 (véase FIGURA 5). Los resultados indican que la expresión de VLP de reconstrucción parcial de L1 31 es 6,9 veces mayor que L1 31 de tipo silvestre. La reconstrucción total de L1 31 tiene una expresión aumentada 1,7 veces sobre la reconstrucción parcial de L1 31. Por lo tanto, los niveles de expresión de L1 31 se aumentaron >7 veces introduciendo secuencias codónicas preferidas por levadura y eliminando señales de terminación de la transcripción potenciales.

Ejemplo 8

Microscopía electrónica de transmisión

Para demostrar que la proteína L1 de VPH31 era de hecho autoensamblable para formar capsómeros de L1 pentaméricos, que a su vez se autoensamblan en partículas de tipo viral, se sometió un extracto proteico de reconstrucción total de L1 31 parcialmente purificado a microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las levaduras se cultivaron en fermentación a pequeña escala y se sedimentaron. Los sedimentos se sometieron a tratamientos de

purificación. Los extractos de levadura clarificados y de sedimentos se analizaron por inmunotransferencia para demostrar expresión de la proteína L1 y retención a través del procedimiento de purificación. Los extractos de levadura clarificados se sometieron después a centrifugación sobre un colchón de sacarosa 45 % y el sedimento resultante se suspendió en tampón para análisis de TEM (véase FIGURA 6). Los resultados indicaron que el diámetro de las partículas esféricas en esta muestra en bruto variaba entre 30 y 60 nanómetros presentando algunas partículas una serie regular de capsómeros.

LISTADO DE SECUENCIAS

10	<110> Merck & Co., Inc. Jansen, Kathrin U. Schultz, Loren D. Neeper, Michael P. Markus, Henry Z.
15	<120> EXPRESIÓN OPTIMIZADA DE L1 DE VPH 31 EN LEVADURA
	<130> 21188-PCT
20	<150> 60/457.172 <151> 24-03-2003
	<160> 8
25	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
	<210> 1 <211> 1515 <212> ADN <213> L1 de VPH31 de tipo silvestre
30	<400> 1
	atgtctctgt ggcggcctag cgaggctact gtctacttac cacctgtccc agtgtctaaa 60 gttgtaagca cggatgaata tgtaacacga accaacatat attatcacgc aggcagtgc 120 aggctgctta cagtaggcca tccatattat tccataccta aatctgacaa tccataaaaa 180 atagttgtac caaagggtgc aggattacaa tatagggtat ttaggggttcg ttaccagat 240 ccaaacaaat ttggatttcc tgatacatct ttttataatc ctgaaactca acgcttagtt 300 tgggcctgtg ttggtttaga ggtagggtcgc gggcagccat taggtgtagg tattagtgg 360 catccattat taaataaatt tgatgacact gaaaactcta atagatatgc cgggtggctct 420 ggcactgata atagggaatg tatatcaatg gattataaac aaacacaact gtgtttactt 480 ggttgcaaac cacctattgg agagcattgg ggtaaaggta gtcctttag taacaatgct 540 attacccctg gtgattgtcc tccattagaa ttaaaaaatt cagttataca agatggggat 600 atggttgata caggctttgg agctatggat tttactgctt tacaagacac taaaagtaat 660 gttcctttgg acatttgtaa ttctatttgg aaatatccag attatcttaa aatgggttgc 720 gagccatatg gcgatacatt atttttttat ttacgtaggg aacaaatggt tgtaaggcat 780 ttttttaata gatcaggcac gggtgggtgaa tgggtcccta ctgacttata tattaaaggc 840 tccgggtcaa cagctacttt agctaacagt acatactttc ctacacctag cggctccatg 900 gttacttcag atgcacaaat ttttaataaa ccatattgga tgcaacgtgc tcaggggacac 960 aataatggta ttgttgggg caatcagtta ttgtttactg tggtagatac cacacgtagt 1020 accaatatgt ctggttgggc tgcaattgca aacagtgata ctacatttaa aagtagtaat 1080 tttaaagagt atttaagaca tggtgaggaa ttgtatttac aatttatatt tcagttatgc 1140 aaaataacat tatctgcaga cataatgaca tatattcaca gtatgaatcc tgctattttg 1200 gaagattgga attttggtg gaccacacct ccctcagggt ctttgaggga tacctatagg 1260 tttgtaacct cacaggccat tacatgtcaa aaaagtgcgc cccaaaagcc caagggaagt 1320 ccattttaaag attatgtatt ttgggaggtt aattttaaag aaaagttttc tgcagattta 1380 gatcagtttc cactgggtcg caaattttta ttacaggcag gatatagggc acgtcctaaa 1440 tttaaagcag gtaaacgtag tgcacctca gcatctacca ctacaccagc aaaacgtaaa 1500 aaaactaaaa agtaa 1515
35	<210> 2 <211> 1515 <212> ADN <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> reconstrucción parcial de 31

<400> 2

atgtctctgt	ggcggcctag	cgaggctact	gtctacttac	cacctgtccc	agtgtctaaa	60
gttgtaagca	cggatgaata	tgtaacacga	accaacatat	attatcacgc	aggcagtgt	120
aggctgctta	cagtaggcca	tccatattat	tccataccta	aatctgacaa	tcctaaaaaa	180
atagttgtac	caaaggtgtc	aggattacaa	tatagggtat	ttagggttcg	tttaccagat	240
ccaaacaaat	ttggatttcc	tgatacatct	ctttataatc	ctgaaactca	acgcttagtt	300
tgggcctgtg	ttggtttaga	ggtaggtcgc	gggcagccat	taggtgtagg	tattagtggg	360
catccattat	taaataaatt	tgatgacact	gaaaactcta	atagatatgc	cgggtggctc	420
ggcactgata	ataggggaatg	tatatcaatg	gattataaac	aaacacaact	gtgtttactt	480
ggttgcaaac	cacctattgg	agagcattgg	ggtaaaggta	gtccttgtag	taacaatgct	540
attaccctcg	gtgattgtcc	tccattagaa	ttaaaaaatt	cagttataca	agatggggat	600
atggttgata	caggctttgg	agctatggat	tttactgctt	tacaagacac	taaaagtaat	660
gttccttttg	acatttgtaa	ttctatttgt	aaatatccag	attatcttaa	aatgggttgc	720
gagccatacg	gcgacacctt	gttcttctat	ttgcgtagag	aacagatgtt	cgtaaggcac	780
ttcttcaaca	gatccggcac	cgtaggtgaa	tctgtcccaa	cggacctgta	catcaagggc	840
tccggttcca	ccgctaccct	ggctaactcc	acctacttcc	caactccatc	tggctccatg	900
gtcacctccg	acgctcagat	cttcaacaag	ccatactgga	tgcagcgtgc	acagggtcac	960
aacaacggta	tctggtgggg	taaccagctg	ttcgtgactg	tggtcgatac	cacgcgttct	1020
accaacatgt	ctgtctgtgc	tgcaatcgct	aactctgaca	ctaccttcaa	gtcctctaac	1080
ttcaaggagt	acctgagaca	tggtgaggaa	ttcgatctgc	aattcatctt	ccagttgtgc	1140
aagatcaccc	tgtctgctga	catcatgacc	tacatccaca	gtatgaaccc	tgccatcctg	1200
gaggactgga	acttcgggtc	gaccactcca	ccttcgggtt	ctttggagga	tacctatagg	1260
tttgtaacct	cacaggccat	tacatgtcaa	aaaagtgcgc	ccaaaagcc	caaggaagat	1320
ccattttaaag	attatgtatt	ttgggaggtt	aatttaaaag	aaaagttttc	tgcagattta	1380
gatcagtttc	cactgggtcg	caaattttta	ttacaggcag	gatatagggc	acgtcctaaa	1440
tttaaagcag	gtaaacgtag	tgcacctca	gcacttacca	ctacaccagc	aaaacgtaaa	1500
aaaactaaaa	agtaa					1515

5

<210> 3
<211> 1515
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> reconstrucción parcial de 31

<400> 3

atgtctttgt	ggagaccatc	tgaagctacc	gtctacttgc	caccagtccc	agtctctaag	60
gtcgtctcta	ccgacgaata	cgtaaccaga	accaacatct	actaccacgc	tggttctgct	120
agattgttga	ccgtcgggtca	cccatactac	tctatcccaa	agtctgacaa	cccaaagaag	180
atcgtcgtcc	caaaggtctc	tggtttgcaa	tacagagtct	tcagagtcag	attgccagac	240
ccaaacaagt	tcggtttccc	agacacctct	ttctacaacc	cagaaaccca	aagattgggtc	300
tgggcttgtg	tcggtttgga	agtcggtaga	ggtaaccat	tgggtgtcgg	tatctctggt	360
cacccattgt	tgaacaagtt	cgacgacacc	gaaaactcta	acagatacgc	tgggtggcca	420
ggtaaccgaca	acagagaatg	tatctctatg	gactacaagc	aaacccaatt	gtgtttgttg	480
ggttgtaagc	caccaatcgg	tgaacactgg	ggtaagggtt	ctccatgttc	taacaacgct	540
atcaccccg	gtgactgtcc	accattggaa	ttgaagaact	ctgtcatcca	agacgggtgac	600
atggtcgaca	cgggtttcgg	tgctatggac	ttcaccgctt	tgcaagacac	caagtctaac	660
gtcccattgg	acatctgtaa	ctctatctgt	aagtaccag	actacttgaa	gatgggtcgt	720
gaaccatacg	gcgacacctt	gttcttctac	ttgcgtagag	aacagatgtt	cgtaaggcac	780
ttcttcaaca	gatccggcac	cgtaggtgaa	tctgtcccaa	cggacctgta	catcaagggc	840
tccggttcca	ccgctaccct	ggctaactcc	acctacttcc	caactccatc	tggctccatg	900
gtcacctccg	acgctcagat	cttcaacaag	ccatactgga	tgcagcgtgc	acagggtcac	960
aacaacggta	tctggtgggg	taaccagctg	ttcgtgactg	tggtcgatac	cacgcgttct	1020
accaacatgt	ctgtctgtgc	tgcaatcgct	aactctgaca	ctaccttcaa	gtcctctaac	1080
ttcaaggagt	acctgagaca	tggtgaggaa	ttcgatctgc	aattcatctt	ccagttgtgc	1140
aagatcaccc	tgtctgctga	catcatgacc	tacatccaca	gtatgaaccc	tgccatcctg	1200
gaggactgga	acttcgggtc	gaccactcca	ccttcgggtt	ctttggaaga	cacctacaga	1260
ttcgtcacct	ctcaagctat	cacctgtcaa	aagtctgctc	cacaaaagcc	aaaggaagac	1320
ccattcaagg	actacgtctt	ctgggaagtc	aacttgaagg	aaaagttctc	tgctgacttg	1380
gaccaattcc	cattgggtag	aaagttcttg	ttgcaagctg	gttacagagc	tagaccaaaag	1440
ttcaaggctg	gtaagagatc	tgtcccatct	gcttctacca	ccacccacgc	taagagaaaag	1500

15

aagaccaaga agtaa

<210> 4
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> L1 de VPH 31

<400> 4

10

Met	Ser	Leu	Trp	Arg	Pro	Ser	Glu	Ala	Thr	Val	Tyr	Leu	Pro	Pro	Val
1				5					10					15	
Pro	Val	Ser	Lys	Val	Val	Ser	Thr	Asp	Glu	Tyr	Val	Thr	Arg	Thr	Asn
			20					25					30		
Ile	Tyr	Tyr	His	Ala	Gly	Ser	Ala	Arg	Leu	Leu	Thr	Val	Gly	His	Pro
		35					40					45			
Tyr	Tyr	Ser	Ile	Pro	Lys	Ser	Asp	Asn	Pro	Lys	Lys	Ile	Val	Val	Pro
	50					55					60				
Lys	Val	Ser	Gly	Leu	Gln	Tyr	Arg	Val	Phe	Arg	Val	Arg	Leu	Pro	Asp
65					70					75					80
Pro	Asn	Lys	Phe	Gly	Phe	Pro	Asp	Thr	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro	Glu	Thr
				85					90					95	
Gln	Arg	Leu	Val	Trp	Ala	Cys	Val	Gly	Leu	Glu	Val	Gly	Arg	Gly	Gln
			100					105					110		
Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Ser	Gly	His	Pro	Leu	Leu	Asn	Lys	Phe	Asp
		115					120					125			
Asp	Thr	Glu	Asn	Ser	Asn	Arg	Tyr	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Thr	Asp	Asn
	130					135					140				
Arg	Glu	Cys	Ile	Ser	Met	Asp	Tyr	Lys	Gln	Thr	Gln	Leu	Cys	Leu	Leu
145					150					155					160
Gly	Cys	Lys	Pro	Pro	Ile	Gly	Glu	His	Trp	Gly	Lys	Gly	Ser	Pro	Cys
				165					170					175	
Ser	Asn	Asn	Ala	Ile	Thr	Pro	Gly	Asp	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Lys
			180					185					190		
Asn	Ser	Val	Ile	Gln	Asp	Gly	Asp	Met	Val	Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Ala
		195					200					205			
Met	Asp	Phe	Thr	Ala	Leu	Gln	Asp	Thr	Lys	Ser	Asn	Val	Pro	Leu	Asp
	210					215					220				
Ile	Cys	Asn	Ser	Ile	Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Leu	Lys	Met	Val	Ala
225					230					235					240
Glu	Pro	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Phe	Phe	Tyr	Leu	Arg	Arg	Glu	Gln	Met
			245						250					255	
Phe	Val	Arg	His	Phe	Phe	Asn	Arg	Ser	Gly	Thr	Val	Gly	Glu	Ser	Val
			260					265					270		
Pro	Thr	Asp	Leu	Tyr	Ile	Lys	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Thr	Leu	Ala
		275					280					285			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser	Gly	Ser	Met	Val	Thr	Ser	Asp
	290					295					300				
Ala	Gln	Ile	Phe	Asn	Lys	Pro	Tyr	Trp	Met	Gln	Arg	Ala	Gln	Gly	His
305					310					315					320
Asn	Asn	Gly	Ile	Cys	Trp	Gly	Asn	Gln	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp
				325					330					335	
Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Ala	Ala	Ile	Ala	Asn	Ser
			340					345					350		
Asp	Thr	Thr	Phe	Lys	Ser	Ser	Asn	Phe	Lys	Glu	Tyr	Leu	Arg	His	Gly
		355					360					365			
Glu	Glu	Phe	Asp	Leu	Gln	Phe	Ile	Phe	Gln	Leu	Cys	Lys	Ile	Thr	Leu
	370					375					380				
Ser	Ala	Asp	Ile	Met	Thr	Tyr	Ile	His	Ser	Met	Asn	Pro	Ala	Ile	Leu
385					390					395					400
Glu	Asp	Trp	Asn	Phe	Gly	Leu	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu

ES 2 381 964 T3

[illegible]

	<210> 5	
	<211> 34	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
10	<400> 5	
	cgtcgacgta aacgtgtatc atatttttt acag	34
	<210> 6	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
20	<400> 6	
	cagacacatg tattacatac acaac	25
	<210> 7	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de PCR	
	<400> 7	
	ctcagatctc acaaaacaaa atgtctctgt ggcggcctag c	41
	<210> 8	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
40	<400> 8	
	gacagatctt acttttttagt tttttacgt ttgctgg	38
45		

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína L1 de VPH31 como se expone en SEC ID N°: 4, comprendiendo el ácido nucleico una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3.
- 5 2. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
3. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 2.
4. La célula huésped de la reivindicación 3, en la que la célula huésped es una célula de levadura.
5. La célula huésped de la reivindicación 3, en la que la célula huésped está seleccionada entre el grupo que consiste en: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces fragilis*,
10 *Kluyveromyces lactis*, y *Schizosaccharomyces pombe*.
6. La célula huésped de la reivindicación 5, en la que la célula huésped es *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Un procedimiento para producir partículas de tipo viral (VLP) de L1 de VPH31, que comprende:
 - (a) transformar levaduras con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1;
 - (b) cultivar la levadura transformada en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido
15 nucleico para producir una proteína del virus del papiloma recombinante; y
 - (c) aislar la proteína del virus del papiloma recombinante para producir las VLP de L1 de VPH31.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, y *Schizosaccharomyces pombe*.
- 20 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
10. Un procedimiento de fabricación de una vacuna para tratamiento o prevención de infecciones por VPH, comprendiendo dicho procedimiento la producción de VLP de L1 de VPH31 por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la vacuna comprende adicionalmente VLP de al menos un
25 tipo de VPH adicional.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que al menos un tipo de VPH adicional está seleccionada del grupo que consiste en: VPH6, VPH11, VPH16, VPH18, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH55, VPH56, VPH58, VPH59 y VPH68.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la vacuna comprende VLP de VPH 16.
- 30 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la vacuna comprende adicionalmente VLP de VPH 18.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la vacuna comprende adicionalmente VLP de VPH 6 y VLP de VPH11.

Alineamiento de secuencia de nucleótidos de L1 de VPH 31

```

31 L1 wt      ( 1) ATGTCTCTGTGGCGGCTAGCGAGGCTACTGTCTACTTACCACCTGTCCC
31 L1 parcial ( 1) .....
31 L1 total   ( 1) .....T.....A.A..ATCT..A.....C.....G.....A.....

31 L1 wt      ( 51) AGTGTCTAAAGTTGTAAGCACGGATGAATATGTAACACGAACCAACATAT
31 L1 parcial ( 51) .....
31 L1 total   ( 51) ...C.....G..C..CTCT..C..C.....C..C..CA.....C..

31 L1 wt      ( 101) ATTATCACGCAGGCAGTGCTAGGCTGCTTACAGTAGGCCATCCATATTAT
31 L1 parcial ( 101) .....
31 L1 total   ( 101) .C..C.....T..TTC.....AT..T.G..C..C..T..C.....C..C

31 L1 wt      ( 151) TCCATACCTAAATCTGACAATCCTAAAAAATAGTTGTACCAAAGGTGTC
31 L1 parcial ( 151) .....
31 L1 total   ( 151) ..T..C..A..G.....C..A..G..G..C..C..C.....C..

31 L1 wt      ( 201) AGGATTACAATATAGGGTATTTAGGGTTCGTTTACCAGATCCAACAAAT
31 L1 parcial ( 201) .....
31 L1 total   ( 201) T..T..G.....C..A..C..C..A..CA..A..G.....C.....G..

31 L1 wt      ( 251) TTGGATTTCCTGATACATCTTTTATAATCCTGAAACTCAACGCTTAGTT
31 L1 parcial ( 251) .....
31 L1 total   ( 251) .C..T..C..A..C..C.....C..C..C..A.....C...A.A..G..C

31 L1 wt      ( 301) TGGGCCTGTGTTGGTTTAGAGGTAGGTCGCGGGCAGCCATTAGGTGTAGG
31 L1 parcial ( 301) .....
31 L1 total   ( 301) .....T.....C.....G..A..C...A.A..T..A.....G.....C..

31 L1 wt      ( 351) TATTAGTGGTCATCCATTATTAAATAAATTTGATGACACTGAAAACCTCTA
31 L1 parcial ( 351) .....
31 L1 total   ( 351) ...CTC.....C.....G..G..C..G..C..C.....C.....

31 L1 wt      ( 401) ATAGATATGCCGGTGGTCCTGGCACTGATAATAGGGAATGTATATCAATG
31 L1 parcial ( 401) .....
31 L1 total   ( 401) .C.....C..T.....A..T..C..C..C..A.....C..T...

```

FIG.1A

31 L1 wt	(451)	GATTATAAACAAACACAACCTGTGTTTACTTGGTTGCAAACACCTATTGG
31 L1 parcial	(451)	
31 L1 total	(451)	..C..C..G.....C...T.....GT.G.....T..G.....A..C..
31 L1 wt	(501)	AGAGCATTGGGGTAAAGGTAGTCCTTGTAGTAACAATGCTATTACCCCTG
31 L1 parcial	(501)	
31 L1 total	(501)	T..A..C.....G...TC...A...TC.....C.....C.....A.
31 L1 wt	(551)	GTGATTGTCCTCCATTAGAATTAATAAATTCAGTTATACAAGATGGGGAT
31 L1 parcial	(551)	
31 L1 total	(551)	...C.....A.....G.....G..G..C..T..C..C.....C..T..C
31 L1 wt	(601)	ATGGTTGATACAGGCTTTGGAGCTATGGATTTTACTGCTTTACAAGACAC
31 L1 parcial	(601)	
31 L1 total	(601)	C..C..C..T..C..T.....C..C..C.....G.....
31 L1 wt	(651)	TAAAAGTAATGTTCCCTTTGGACATTTGTAATTCTATTTGTAAATATCCAG
31 L1 parcial	(651)	
31 L1 total	(651)	C..GTC...C..C..A.....C.....C.....C.....G..C....
31 L1 wt	(701)	ATTATCTTAAATGGTTGCTGAGCCATATGGCGATACATTATTTTTTTAT
31 L1 parcial	(701)	C.....C..C..G..C..C..C
31 L1 total	(701)	.C..CT.G..G.....C.....A.....C.....C..C..G..C..C..C
31 L1 wt	(751)	TTACGTAGGGAACAAATGTTTGTAAGGCATTTTTTAATAGATCAGGCAC
31 L1 parcial	(751)	..G.....A.....G.....C.....C..C..C..C.....C.....
31 L1 total	(751)	..G.....A.....G.....C.....C..C..C..C.....C.....
31 L1 wt	(801)	GGTTGGTGAATCGGTCCCTACTGACTTATATATTAAGGCTCCGGTTCAA
31 L1 parcial	(801)	C..A.....T.....A..C...C.G..C..C..G.....C.
31 L1 total	(801)	C..A.....T.....A..C...C.G..C..C..G.....C.
31 L1 wt	(851)	CAGCTACTTTAGCTAACAGTACATACTTTCCTACACCTAGCGGCTCCATG
31 L1 parcial	(851)	.C.....CC.G.....TCC..C.....C..A..T..ATCT.....
31 L1 total	(851)	.C.....CC.G.....TCC..C.....C..A..T..ATCT.....
31 L1 wt	(901)	GTTACTTCAGATGCACAAATTTTAAATAAACCATATTGGATGCAACGTGC
31 L1 parcial	(901)	..C..C..C..C..T..G..C..C..C..G.....C.....G.....
31 L1 total	(901)	..C..C..C..C..T..G..C..C..C..G.....C.....G.....

FIG.1B

31 L1 wt	(951)	TCAGGGACACAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGTTATTTGTTACTG
31 L1 parcial	(951)	A.....T.....C..C.....C.....T..C...C.G..C..G....
31 L1 total	(951)	A.....T.....C..C.....C.....T..C...C.G..C..G....
31 L1 wt	(1001)	TGGTAGATACCACACGTAGTACCAATATGTCTGTTTGTGCTGCAATTGCA
31 L1 parcial	(1001)	C.....G...TC.....C.....C.....C...T
31 L1 total	(1001)	C.....G...TC.....C.....C.....C...T
31 L1 wt	(1051)	AACAGTGATACTACATTTAAAAGTAGTAATTTTAAAGAGTATTTAAGACA
31 L1 parcial	(1051)	...TC...C.....C..C..GTCCTC...C..C..G....CC.G.....
31 L1 total	(1051)	...TC...C.....C..C..GTCCTC...C..C..G....CC.G.....
31 L1 wt	(1101)	TGGTGAGGAATTTGATTTACAATTTATATTTTCAGTTATGCAAAATAACAT
31 L1 parcial	(1101)	C...C.G....C..C..C.....G....G..C..CC
31 L1 total	(1101)	C...C.G....C..C..C.....G....G..C..CC
31 L1 wt	(1151)	TATCTGCAGACATAATGACATATATTCACAGTATGAATCCTGCTATTTTG
31 L1 parcial	(1151)	.G.....T....C.....C..C..C.....C.....C..CC..
31 L1 total	(1151)	.G.....T....C.....C..C..C.....C.....C..CC..
31 L1 wt	(1201)	GAAGATTGGAATTTTGGATTGACCACACCTCCCTCAGGTTCTTTGGAGGA
31 L1 parcial	(1201)	..G..C.....C..C..TC.....T..A..T..C.....
31 L1 total	(1201)	..G..C.....C..C..TC.....T..A..T..C.....A..
31 L1 wt	(1251)	TACCTATAGGTTTGTAACTCACAGGCCATTACATGTCAAAAAAGTGCCC
31 L1 parcial	(1251)	
31 L1 total	(1251)	C.....C..A..C..C.....T..A..T..C..C.....GTC...T.
31 L1 wt	(1301)	CCCAAAAGCCCAAGGAAGATCCATTTAAAGATTATGTATTTTGGGAGGTT
31 L1 parcial	(1301)	
31 L1 total	(1301)	.A.....A.....C.....C..G..C..C..C.....A..C
31 L1 wt	(1351)	AATTTAAAAGAAAAGTTTCTGCAGATTTAGATCAGTTTCCACTGGGTCG
31 L1 parcial	(1351)	
31 L1 total	(1351)	..C..G..G.....C.....T..C..G..C..A..C...T....A.
31 L1 wt	(1401)	CAAATTTTATTACAGGCAGGATATAGGGCACGTCCTAAATTTAAAGCAG
31 L1 parcial	(1401)	
31 L1 total	(1401)	A..G..C..G..G..A..T..T..C..A..TA..A..A..G..C..G..T.

FIG.1C

```

31 L1 wt      (1451) GTAAACGTAGTGCACCCTCAGCATCTACCACTACACCAGCAAAACGTAAA
31 L1 parcial (1451) .....
31 L1 total   (1451) ....GA.ATC...T..A..T..T.....C..C.....T..GA.A..G

31 L1 wt      (1501) AAAACTAAAAAGTAA (SEC ID N°: 1)
31 L1 parcial (1501) ..... (SEC ID N°: 2)
31 L1 total   (1501) .....(SEC ID N°: 3)

```

FIG.1D

Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de reconstrucción total de L1 de VPH 31

```

      M S L W R P S E A T V Y L P P V P
1  ATGTCTTTGT GGAGACCATC TGAAGCTACC GTCTACTTGC CACCAGTCCC

      V S K V V S T D E Y V T R T N I Y
51 AGTCTCTAAG GTCGTCTCTA CCGACGAATA CGTCACCAGA ACCAACATCT

      Y H A G S A R L L T V G H P Y Y
101 ACTACCACGC TGGTTCTGCT AGATTGTTGA CCGTCGGTCA CCCATACTAC

      S I P K S D N P K K I V V P K V S
151 TCTATCCCAA AGTCTGACAA CCCAAAGAAG ATCGTCGTCC CAAAGGTCTC

      G L Q Y R V F R V R L P D P N K F
201 TGGTTTGCAA TACAGAGTCT TCAGAGTCAG ATTGCCAGAC CCAAACAAGT

      G F P D T S F Y N P E T Q R L V
251 TCGGTTTCCC AGACACCTCT TTCTACAACC CAGAAACCCA AAGATTGGTC

      W A C V G L E V G R G Q P L G V G
301 TGGGCTTG TG TCGGTTTGGA AGTCGGTAGA GGTCAACCAT TGGGTGTCGG

      I S G H P L L N K F D D T E N S N
351 TATCTCTGGT CACCCATTGT TGAACAAGTT CGACGACACC GAAAACTCTA

      R Y A G G P G T D N R E C I S M
401 ACAGATACGC TGGTGGTCCA GGTACCGACA ACAGAGAATG TATCTCTATG

      D Y K Q T Q L C L L G C K P P I G
451 GACTACAAGC AAACCCAATT GTGTTTGTTG GGTTGTAAGC CACCAATCGG

      E H W G K G S P C S N N A I T P G
501 TGAACACTGG GGTAAGGGTT CTCCATGTTT TAACAACGCT ATCACCCAG

      D C P P L E L K N S V I Q D G D
551 GTGACTGTCC ACCATTGGAA TTGAAGAACT CTGTCATCCA AGACGGTGAC

```

FIG. 2A

M V D T G F G A M D F T A L Q D T
601 ATGGTCGACA CCGGTTTCGG TGCTATGGAC TTCACCGCTT TGCAAGACAC

K S N V P L D I C N S I C K Y P D
651 CAAGTCTAAC GTCCCATTGG ACATCTGTAA CTCTATCTGT AAGTACCCAG

Y L K M V A E P Y G D T L F F Y
701 ACTACTTGAA GATGGTCGCT GAACCATACG GCGACACCTT GTTCTTCTAC

L R R E Q M F V R H F F N R S G T
751 TTGCGTAGAG AACAGATGTT CGTAAGGCAC TTCTTCAACA GATCCGGCAC

V G E S V P T D L Y I K G S G S T
801 CGTAGGTGAA TCTGTCCCAA CCGACCTGTA CATCAAGGGC TCCGGTTCCA

A T L A N S T Y F P T P S G S M
851 CCGCTACCCT GGCTAACTCC ACCTACTTCC CAACTCCATC TGGCTCCATG

V T S D A Q I F N K P Y W M Q R A
901 GTCACCTCCG ACGCTCAGAT CTTCAACAAG CCATACTGGA TGCAGCGTGC

Q G H N N G I C W G N Q L F V T V
951 ACAGGGTCAC AACAAACGGTA TCTGTTGGGG TAACCAGCTG TTCGTGACTG

V D T T R S T N M S V C A A I A
1001 TGGTCGATAC CACGCGTTCT ACCAACATGT CTGTCTGTGC TGCAATCGCT

N S D T T F K S S N F K E Y L R H
1051 AACTCTGACA CTACCTTCAA GTCCTCTAAC TTCAAGGAGT ACCTGAGACA

G E E F D L Q F I F Q L C K I T L
1101 TGGTGAGGAA TTCGATCTGC AATTCATCTT CCAGTTGTGC AAGATCACCC

S A D I M T Y I H S M N P A I L
1151 TGTCTGCTGA CATCATGACC TACATCCACA GTATGAACCC TGCCATCCTG

E D W N F G L T T P P S G S L E D
1201 GAGGACTGGA ACTTCGGTCT GACCACTCCA CCTTCCGGTT CTTTGGAAGA

FIG.2B

T Y R F V T S Q A I T C Q K S A P
 1251 CACCTACAGA TTCGTCACCT CTCAAGCTAT CACCTGTCAA AAGTCTGCTC

 Q K P K E D P F K D Y V F W E V
 1301 CACAAAAGCC AAAGGAAGAC CCATTCAAGG ACTACGTCTT CTGGGAAGTC

 N L K E K F S A D L D Q F P L G R
 1351 AACTTGAAGG AAAAGTTCTC TGCTGACTTG GACCAATTCC CATTGGGTAG

 K F L L Q A G Y R A R P K F K A G
 1401 AAAGTTCTTG TTGCAAGCTG GTTACAGAGC TAGACCAAAG TTCAAGGCTG

 K R S A P S A S T T T P A K R K
 1451 GTAAGAGATC TGCTCCATCT GCTTCTACCA CCACCCCAGC TAAGAGAAAG

 K T K K * (SEC ID N°: 4)
 1501 AAGACCAAGA AGTAA (SEC ID N°: 3)

FIG.2C

SUMARIO DE SECUENCIAS DE VPH 31

CONSTRUCCIÓN DE L1	NUCLEÓTIDOS	AMINOÁCIDOS	IDENTIDAD DE NUCLEÓTIDOS	IDENTIDAD DE AMINOÁCIDOS	COMENTARIOS
LA DE VPH 31 TIPO SILVESTRE	1515	504			
L1 DE VPH 31 RECONSTRUCCIÓN PARCIAL	1515	504	92%	100%	121 CAMBIOS ENTRE nt 697-1249
L1 DE VPH 31 RECONSTRUCCIÓN TOTAL	1515	504	75%	100%	376 CAMBIOS ENTRE nt 1-1515

FIG.3

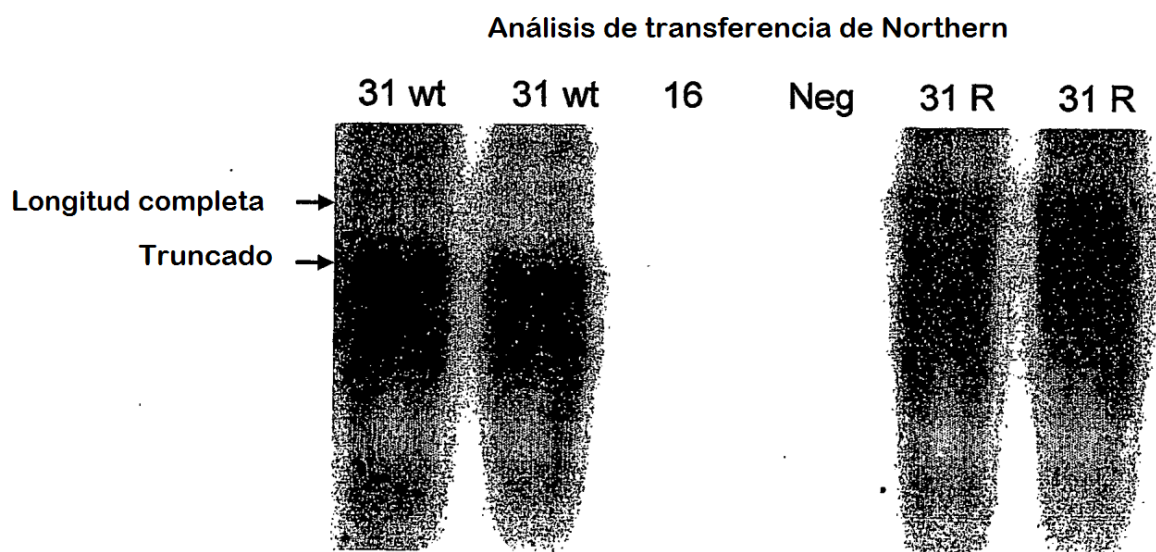


FIG.4

RESULTADOS DE RADIOINMUNOENSAYO

EXP.	CONSTRUCCIÓN DE L1	CONCENTRACIÓN PROTEICA (mg/ml)	RIA MENOS FONDO (cpm/ml)	VLP* DE L1 31/ mg proteína (cpm/mg)	MEDIA (cpm/mg)	RELACIÓN (Med/Med)
1	31 TIPO SILVESTRE	1,64	414	252		
		1,62	987	609	460	1
		1,82	904	497		(31 wt/31 wt)
		1,76	844	480		
1	31 RECONSTRUCCIÓN PARCIAL	1,67	5061	3031	3158	6,9
		1,55	5091	3285		(31 PARCIAL/31 wt)
2	31 RECONSTRUCCIÓN PARCIAL	2,27	3901	1719		
		2,27	4081	1798	2095	1
		2,38	7135	2998		(31 PARCIAL/31 PARCIAL)
		2,38	4428	1861		
2	31 RECONSTRUCCIÓN TOTAL	2,07	6628	3202	3645	1
		2,07	8461	4087		(31 TOTAL/31 PARCIAL)

FIG.5

Microscopía electrónica de transmisión

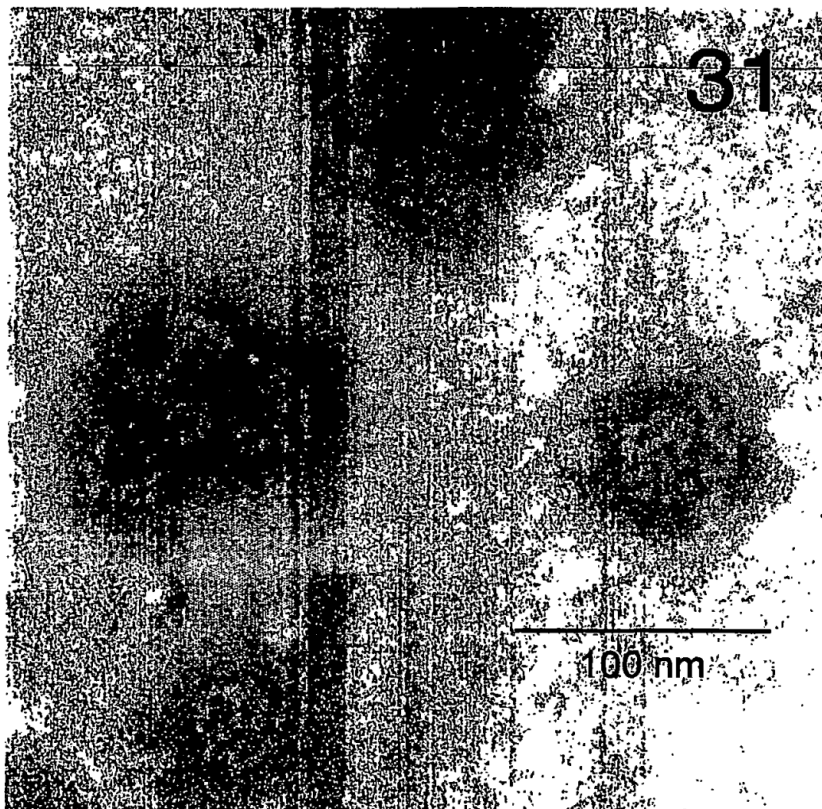


FIG.6