

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 052**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2010 PCT/ES2010/070717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11054996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2010 E 10809153 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2497494**

54 Título: **Vacunas para el tratamiento de neoplasias a partir de capsides virales de birnavirus
conteniendo antígenos del virus del papiloma humano**

30 Prioridad:

06.11.2009 ES 200930967

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

09.05.2018

73 Titular/es:

**CHIMERA PHARMA, S. L. U. (100.0%)
Ronda de Poniente 4 bajo C-D
28760 Tres Cantos (Madrid), ES**

72 Inventor/es:

**ZURCHER, THOMAS;
VON KOBBE, CAYETANO;
BERNAL, JUAN JOSÉ;
JIMENEZ TORRES, IGNACIO;
CALDERITA LUCAS, GLORIA;
RODRIGUEZ GARCIA, MARGARITA;
GARZON GUTIERREZ, ANA;
GONDAR SOUSA E SILVA, VIRGINIA;
GARCIA DE CASTRO, ARCADIO y
PINO DE LA HUERGA, IRENE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 667 052 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

Vacunas para el tratamiento de neoplasias a partir de capsides virales de birnavirus conteniendo antígenos del virus del papiloma humano.

La invención se refiere a vacunas terapéuticas para el tratamiento de neoplasias originadas por el virus del papiloma humano (VPH). En particular, las vacunas de la presente descripción están formadas por cápsides pseudo-virales quiméricas de birnavirus conteniendo antígenos de papilomavirus.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los virus del papiloma humano (VPH, o HPV del inglés *Human Papilloma Virus*) son los principales responsables del desarrollo de neoplasias intrauterinas y con frecuencia están asociados también a otras neoplasias como por ejemplo cáncer anal, cáncer vulvar, cáncer de pene o carcinoma orofaríngeo de células escamosas. La infección por VPH puede pasar inadvertida durante años tras los cuales puede manifestarse como una neoplasia local en distintos grados de progresión. Es por esto que en las mujeres se llevan a cabo citologías regulares destinadas a identificar células premalignas y en su caso el tipo de virus causante. Las cepas de VPH más frecuentes asociadas a neoplasias intrauterinas locales son VPH-16 y VPH-18, implicadas en el 70% de todos los casos de cáncer de cérvix. El efecto oncogénico de estos VPH está mediado por la integración de parte de su genoma, en particular los genes de expresión temprana E6 y E7, en el genoma de las células epiteliales basales infectadas.

En la actualidad existen en el mercado vacunas profilácticas para la prevención de la infección por el virus del papiloma como por ejemplo Gardasil® y Cervarix®. Estas vacunas resultan eficaces en la prevención de la infección por los virus del papiloma humano de las cepas VPH-16, VPH-18, VPH-11 y VPH-6, pero no han demostrado eficacia en un contexto terapéutico una vez el VPH ha transformado la célula infectada en una célula precancerígena.

Se estima que sólo en E.E.U.U. 10 millones de mujeres entran en contacto con VPH cada año y se prevé que un 23 % de estas mujeres desarrollen neoplasias intrauterinas locales (CIN, del inglés Cervical Intrauterine Neoplasias) en alguno de sus grados, alguna vez en su vida [Hoory T et al. (2008) J. Formos Med. Assoc 107(3):198-217]. Más aún, cada año mueren 275,000 mujeres en el mundo por cáncer de cuello de útero resultante de una evolución desfavorable de las CIN. Aunque en la actualidad los programas de prevención y seguimiento del cáncer de cérvix mediante revisiones ginecológicas periódicas y la extirpación quirúrgica de las CIN resultan eficaces, sería deseable disponer de un abordaje terapéutico no invasivo que evite los posibles problemas y costes asociados a la cirugía.

Existen precedentes en el desarrollo de vacunas terapéuticas para el tratamiento de CIN que incorporan antígenos E6 y/o E7 del virus del papiloma [Lin Y. et al. (2007) Frontier in Bioscience, 12: 246-264; Leggett GR et al. (2007) Current Opin. Immunology, 19: 232-238; Hung CF et al. (2007) Exp. Mol. Med, 39(6):679-689; Hoory T et al. (2008) J. Formos Med. Assoc, 107(3):198-217]. Estos incluyen vacunas de ADN [Yan Q. et al (2007) Gynecologic Onco., 104:199-206; Yan J. et al. (2009) Vaccine, 27:431-440], vacunas a partir de péptidos desnudos [Daffarin PM. et al (2007) J. Translational Med., 5:26; Toubaji A. et al. (2007) Vaccine, 25: 5882-5891; Smith KA. et al. (2009) Clin. Cancer Res. 15(19):6167-6176], y vacunas en las que los antígenos de VPH están ligados o fusionados a otras entidades biológicas, como por ejemplo adenilato ciclasa de Bordetella pertussis [Preville X. et al. (2005) Cancer Res., 65(2):641-649], antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4) [Zheng Y. et al. (2009) J. Microbiol., 46(6):728-736] o 1,3-1,4 beta-glucanasa de Clostridium thermocellum [Venuti A. et al. (2009) Vaccine, 27 (25-26):3395-3397]. En el caso de vacunas que utilizan la presentación de antígenos sobre macroestructuras biológicas, un ejemplo lo constituyen las partículas pseudo-virales (VLP, del inglés Virus-Like Particles) quiméricas formadas a partir de proteínas virales estructurales que incorporan antígenos relevantes a una enfermedad. En este sentido existen precedentes que incorporan los antígenos E7 en VLP de Hepatitis B [Tindle RW. et al. Virology (1994) 1;200(2):547-57]. Entre las VLP propuestas para la presentación de antígenos se encuentran aquellas derivadas del Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV, del inglés *Infectious Bursal Disease Virus*). IBDV pertenece a la familia Birnaviridae y es el agente causante de la enfermedad de Gumboro en aves. Las partículas virales de IBDV son icosaédricas con simetría T=13 y están formadas por 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) reforzada en su parte interna por la proteína estructural VP3 (29 kDa). En el ensamblado normal del virión los componentes proteicos de la cápside viral resultan de la proteólisis del polipéptido precursor pVP2-VP4-VP3 (109 kDa) para liberar el precursor de VP2 de 512 aminoácidos (pVP2₅₁₂), VP4 y VP3. La posterior escisión de aminoácidos en el carboxilo terminal de pVP2₅₁₂ da lugar a la forma madura de VP2 de 441 aminoácidos (VP2₄₄₁) presente en el virión [Da Costa B. et al. J. Virology (2002) 76(5):2393-2402]. La VP2 encontrada en distintas cepas de IBDV presenta una homología de secuencia de proteína de más del 80%. Las VP2 de otros Birnaviridae comparten con IBDV homología en su secuencia de proteína de un 40% en el caso de Birnavirus acuáticos y un 30% de Birnavirus de Drosophila [Coulibaly F. et al. (2005) Cell 125,120(6):761-772].

La expresión del polipéptido precursor pVP2-VP4-VP3 de IBDV en células eucariotas resulta en la formación de VLP de simetría T=13 icosaédricas, idénticas a las cápsides nativas de IBDV [Martínez-Torre Cuadrada JL. et al. (2001) J. Virology 75(22):10815-10828]. Asimismo, la expresión de VP2 en células eucariotas en ausencia de otras proteínas

de IBDV resulta en la formación de partículas icosaedricas VLP de simetría T=1 más pequeñas que las que constituyen el IBDV [Martínez-Torrecuadrada JL. et al. (2003) Vaccine 21(17-18):1952-1960]. Esto ha sido aprovechado en el diseño y expresión de VLP quiméricas que incorporan del antígeno BT de la fiebre aftosa en VLP T=1 a partir de fusiones en el carboxilo terminal de VP2 [WO2007009673].

La capacidad de fusiones o inserciones de VP2 de formar VLP T=1 de forma eficiente en un sistema de expresión en eucariotas depende en gran medida de la longitud de la VP2 [WO2005105834; Saugar I. et al. (2005) Structure 13(7):1007-1117], del lugar de inserción de estos insertos en la secuencia de VP2, y de la secuencia de los insertos que se introduzcan en VP2 [Rémond M. et al (2009) Vaccine. 27(1):93-8]. Sin embargo, la capacidad de las VLP quiméricas obtenidas para inducir una respuesta inmune adecuada en un modelo animal resulta impredecible.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En el diseño de vacunas terapéuticas contra VPH sería deseable contar con un sistema de presentación de antígenos de VPH que genere una respuesta inmune celular específica y eficaz. En la presente invención se combinan secuencias de VP2 de IBDV, particularmente el fragmento VP2₄₅₂, y de E7 de VPH, particularmente el fragmento de SEQ ID NO: 6, con el fin de obtener una vacuna terapéutica eficaz para el tratamiento de tumores inducidos por el VPH. No resulta obvio que secuencias de E7 o de VP2 pueden resultar idóneas en la generación de la vacuna, ni tampoco el lugar óptimo de fusión o inserción de E7 con VP2. Por esto, en la presente invención se lleva cabo un proceso de búsqueda de VLP T=1 quiméricas a partir de fusiones e inserciones de E7 en VP2 de IBDV que resultan en la selección de las VLP quiméricas más eficaces en el tratamiento de lesiones causadas por VPH.

El objeto de la invención es proporcionar una vacuna eficaz en el tratamiento de neoplasias originadas por el virus del papiloma humano. Las vacunas terapéuticas de la presente invención consisten en partículas pseudo-virales quiméricas formadas a partir de fusiones e inserciones de la SEQ ID NO: 6 de la proteína E7 del VPH humano y la SEQ ID NO: 4 de VP2 del virus de la bursitis infecciosa. El proceso de búsqueda y selección llevado a cabo resulta en partículas pseudo-virales a partir de fusiones e inserciones de E7_{Δ1-44} de VPH con VP2₄₅₂ de IBDV con una mayor eficacia antitumoral y objeto de la presente invención.

La presente descripción se refiere a partículas pseudo-virales (VLP) quiméricas a partir de VP2 de birnavirus que incorporan secuencias de oncogenes de VPH. La fusión o inserción de secuencias ajenas a birnavirus en VP2 resulta a menudo en modificaciones en la estructura tridimensional de la proteína que afectan negativamente a su capacidad de autoensamblarse y formar cápsides pseudo-virales de forma eficiente. Este efecto negativo no sólo depende del punto de inserción sino también de la secuencia de aminoácidos y longitud del inserto. No resulta por tanto obvio *a priori* qué puntos de inserción y secuencias de aminoácidos insertadas resultan en una eficiente formación de VLP quiméricas. Asimismo, la formación de VLP que incorporan secuencias oncogénicas de VPH no es condición suficiente para generar una vacuna terapéutica eficiente frente a tumores sino que esto depende de la disposición final de los antígenos de E7 en la VLP quimérica formada.

Las VLP quiméricas de la presente invención se obtienen de un proceso de selección en el que se identifica la secuencia de E7 óptima para la formación de VLP y los lugares de fusión o inserción en VP2 que dan lugar a VLP quiméricas con una mayor eficacia en el tratamiento de tumores expresando las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH-16.

En primer lugar, tal y como se describe sin limitación en el Ejemplo 1, se evalúan fusiones de secuencias truncadas de E7 de VPH-16 al extremo carboxilo terminal de secuencias de VP2 truncadas en el carboxilo terminal. Entre otras, se evalúan fusiones de secuencias de E7 en las que se han eliminado los aminoácidos 1 a 35 (E7_{Δ1-35}) [SEQ ID NO: 3] al extremo carboxilo de la VP2 truncada en el extremo carboxilo a partir del aminoácido 452 (VP2₄₅₂) [SEQ ID NO: 4]. Con el objetivo de mejorar la expresión también se evalúan diversas fusiones de E7_{Δ1-35} al carboxilo terminal de VP2₄₄₁, VP2₄₄₃, VP2₄₄₆, VP2₄₄₉ y VP2₄₅₀ resultantes de la eliminación de aminoácidos del carboxilo terminal de VP2₄₅₂. En ningún caso se supera la eficiencia en la producción de VLP quiméricas de las fusiones VP2₄₅₂-E7_{Δ1-35} [SEQ ID NO: 5]. Para seleccionar las secuencias de E7 que fusionadas al extremo carboxilo terminal de VP2 dan lugar a una mayor expresión, se evalúan fusiones al extremo carboxilo terminal de VP2₄₅₂ de las siguientes secuencias de E7 truncadas: E7_{Δ1-40}, E7_{Δ1-41}, E7_{Δ1-44}. La fusión de E7 truncada E7_{Δ1-44} [SEQ ID NO: 6] con la Arginina (R) del extremo carboxilo terminal de VP2₄₅₂ [SEQ ID NO: 4] resulta en una construcción VP2₄₅₂-E7_{Δ1-44} [SEQ ID NO: 7] con una eficiencia en la producción de VLP quiméricas superior a otras evaluadas. Asimismo las VLP con la secuencia de aminoácidos VP2₄₅₂-E7_{Δ1-44} demuestran ser eficaces en la eliminación de tumores que expresan las proteínas E6 y E7 del VPH-16 en modelos animales y constituyen un primer aspecto de la presente invención. Por tanto, la presente invención incorpora partículas pseudo-virales quiméricas a partir de la secuencia de E7 de VPH-16 en la que se han eliminado los aminoácidos 1 a 44 (E7_{Δ1-44}), fusionada al carboxilo terminal de VP2 truncada en el extremo carboxilo a partir del aminoácido 452 (VP2₄₅₂). Se contempla que estas fusiones puedan contener variaciones o inserciones en su secuencia de aminoácidos de 7, y hasta 10 aminoácidos, en particular en los puntos de fusión entre VP2₄₅₂ y E7_{Δ1-44} y como resultado del uso de secuencias de clonaje.

En un segundo lugar, tal y como se describe sin limitación en el Ejemplo 2, se evalúan inserciones al azar de secuencias de E7 de VPH-16 en las que se han eliminado los aminoácidos 1 a 44 (E7_{Δ1-44}) [SEQ ID NO: 6] en distintos puntos en la secuencia de VP2 truncada en el extremo carboxilo a partir del aminoácido 452 (VP2₄₅₂) [SEQ ID NO: 4]. El procedimiento de identificación y selección de los candidatos con un mayor potencial de eficacia en el tratamiento de tumores subcutáneos expresando las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH-16 se lleva a cabo según los pasos siguientes. En un primer paso, se realizan inserciones al azar de E7_{Δ1-44} en VP2₄₅₂ y se eliminan todas aquellas construcciones que no resultan en la eficiente expresión de VLP. En un segundo paso se lleva a cabo un proceso de selección de los candidatos que producen VLP de forma eficiente y demuestran contener la secuencia de E7_{Δ1-44}. En un tercer paso se seleccionan aquellas VLP quiméricas que generan una respuesta inmune celular significativa contra la proteína E7. En un cuarto paso se evalúa la capacidad de las VLP quiméricas seleccionadas de proporcionar un efecto antitumoral en un modelo animal de neoplasia asociada a la expresión de E7. Como resultado final del proceso se seleccionan tres VLP quiméricas que representan realizaciones preferidas de la presente invención, esto es VP2₄₅₂(L₄₃₆↑E7_{Δ1-44}↑K₄₃₇) en la que la secuencia de E7_{Δ1-44} está insertada entre la Leucina (L) en la posición 436 y la Lisina (K) en la posición 437 de la VP2₄₅₂ [SEQ ID NO: 8]; VP2₄₅₂(A₄₄₁↑E7_{Δ1-44}↑F₄₄₂) en la que la secuencia de E7_{Δ1-44} está insertada entre la Alanina (A) en la posición 441 y la Fenilalanina (F) en la posición 442 de VP2₄₅₂ [SEQ ID NO: 9]; y VP2₄₅₂(A₄₅₀↑E7_{Δ1-44}↑I₄₅₁) en la que la secuencia de E7_{Δ1-44} está insertada entre la Alanina (A) en la posición 450 y la Isoleucina (I) en la posición 451 de la VP2₄₅₂ [SEQ ID NO: 10].

Por tanto, en la presente invención se describen partículas pseudo-virales quiméricas a partir de una secuencia de E7 de VPH-16 en la que se han eliminado los aminoácidos 1 a 44 (E7_{Δ1-44}), insertada en la VP2 truncada en el extremo carboxilo a partir del aminoácido 452 (VP2₄₅₂) en las posiciones L₄₃₆↑K₄₃₇, A₄₄₁↑F₄₄₂ y A₄₅₀↑I₄₅₁. Se contempla que estas fusiones contengan variaciones o inserciones en su secuencia de hasta 15 aminoácidos en cada uno de los extremos del inserto, en particular en los puntos de fusión entre VP2₄₅₂ y E7_{Δ1-44}, como resultado del uso de secuencias de clonaje y como resultado de la adición espaciadores que aumentan la flexibilidad de la inserción (en inglés "linkers").

Un primer aspecto de la invención se refiere a una partícula pseudo-viral (VLP) quimérica (de aquí en adelante, VLP quimérica de la invención) formada por una proteína de fusión (de aquí en adelante, proteína de fusión de la invención) que comprende:

- una subunidad (a) que consiste en el fragmento de proteína pVP2 de IBDV VP2₄₅₂ de SEQ ID NO: 4, y
- una subunidad (b) que consiste en la SEQ ID NO: 6 del virus del papiloma humano (VPH),

donde la subunidad (b) está unida al extremo carboxilo terminal de la subunidad (a) o la subunidad (b) está insertada en la subunidad (a).

El término "cápside pseudo-viral", "partícula pseudo-viral" o "VLP" (del inglés *Virus-Like Particle*) se refiere a una estructura nanométrica tridimensional formada por el ensamblado de proteínas virales estructurales. En la presente invención, las proteínas virales estructurales que forman la partícula pseudo-viral de la invención son proteínas de fusión que comprenden el fragmento de proteína pVP2 de IBDV VP2₄₅₂ de SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6 de VPH.

El término Birnavirus se refiere a cualquier virus de la familia *Birnaviridae*, perteneciente al Grupo III según la Clasificación de Baltimore. La familia *Birnaviridae* está constituida por los géneros *Avibirnavirus*, *Aquabirnavirus*, *Blosnavirus* y *Entomobirnavirus*. En la presente invención, el Birnavirus es de la familia *Avibirnavirus*, y es el Virus de la Bursitis infecciosa (IBDV).

El término "virus de la bursitis infecciosa" o "IBDV" (IBDV, del inglés *Infectious Bursal Disease Virus*) se refiere a virus de la familia *Birnaviridae* y genero *Avibirnavirus* causantes de la enfermedad de Gumboro en pollos y que pertenecen al Grupo III de la Clasificación de Baltimore. Preferiblemente, el IBDV es el IBDV cepa Soroa.

El genoma de los Birnavirus consta de dos moléculas lineales de ARN de doble cadena denominadas A y B, que codifican 5 proteínas. El gen VP2, enclavado en el segmento A, codifica la proteína precursora de la proteína VP2 (pVP2). La eliminación del extremo carboxilo terminal de pVP2 por proteólisis da lugar a la proteína VP2 madura, que es la proteína principal que constituye la cápside viral.

El término "proteína pVP2" o "pVP2", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la proteína precursora de VP2 codificada por el gen VP2 de un Birnavirus. Preferiblemente, este término se refiere a la proteína precursora de VP2 de 512 aminoácidos (VP2₅₁₂) del IBDV.

La secuencia de aminoácidos de la proteína VP2₅₁₂ del IBDV cepa Soroa (SEQ ID NO: 1) se encuentra depositada con el número de acceso AAD30136 en NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*). La proteína VP2₅₁₂ en otras cepas de IBDV presenta al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1. Por tanto, en una realización preferida, el término pVP2 se refiere a una proteína con al menos un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un

98% o un 99% de identidad, con SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida el término pVP2 se refiere a la SEQ ID NO: 1.

5 El término "identidad", tal y como se utiliza en esta descripción, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias de aminoácidos puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

10 El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína pVP2, de al menos 400 aminoácidos, capaz de formar VLP. Este término incluye, por tanto, la proteína VP2 madura de 441 aminoácidos del IBDV (VP2₄₄₁).

15 En una realización preferida de esta descripción, la subunidad (a) de la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención consiste en una proteína con al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma. En una realización más preferida de esta descripción, la subunidad (a) de la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención consiste en una proteína con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma. En la presente invención, la subunidad (a) de la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención consiste en la SEQ ID NO: 4.

20 El término "virus del papiloma humano" o "VPH" se refiere a virus de la familia *Papillomaviridae* perteneciente al Grupo I de la Clasificación de Baltimore, y que tienen por tanto, un genoma de ADN bicatenario. Se conocen más de 100 tipos diferentes de virus de papiloma humano. Las cepas VPH más frecuentemente asociadas a neoplasias intrauterinas son VPH-16 y VPH-18. El efecto oncogénico de estos VPH está mediado por la integración de parte de su genoma, en particular los genes de expresión temprana E6 y E7, en el genoma de las células epiteliales basales infectadas.

25 El término "proteína de expresión temprana E6", "oncogen de expresión temprana E6" o "E6" se refiere a la proteína codificada por el gen de expresión temprana E6 de un VPH, y más preferiblemente, del VPH-16 o del VPH-18.

30 El término "proteína de expresión temprana E7", "oncogen de expresión temprana E7" o "E7" se refiere a la proteína codificada por el gen de expresión temprana E7 de un VPH, y más preferiblemente, del VPH-16 o del VPH-18.

35 La secuencia de aminoácidos prototípica de la proteína de expresión temprana E7 del VPH tipo 16 [SEQ ID NO: 2] se encuentra depositada con el número de acceso NP_041326 en el NCBI. Por tanto, en una realización preferida de esta descripción, el término proteína de expresión temprana E7 se refiere a una proteína con al menos un 30%, un 40%, un 50%, un 70%, un 90%, un 95%, un 98%, o un 99% de identidad, con la SEQ ID NO: 2. En una realización más preferida de esta descripción, el término proteína de expresión temprana E7 de VPH se refiere a la SEQ ID NO: 2.

40 En otra realización preferida de esta descripción, la subunidad (b) de la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención consiste en una proteína con al menos un 30% de identidad con la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma. En una realización más preferida de esta descripción, la subunidad (b) de la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención consiste en una proteína con la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma. En la presente invención, la subunidad (b) de la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención consiste en la SEQ ID NO: 6.

45 En este primer aspecto de la invención, la subunidad (b) puede estar unida al extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) para dar lugar a la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención. Esta unión puede ser directa o mediante un polipéptido espaciador.

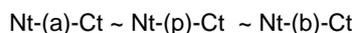
50 El término "polipéptido espaciador" o "linker", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una secuencia de aminoácidos corta, preferiblemente, de hasta 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente, de hasta 15 aminoácidos de longitud, y aún más preferiblemente, de hasta 10 aminoácidos de longitud, situada entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad (b) y la secuencia de aminoácidos de la subunidad (a).

55 Cuando la unión es directa entre las subunidades (a) y (b) de la proteína de fusión que forma la VLP de la invención, el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal de la subunidad (b), tal y como se representa en el siguiente esquema:

60
$$\text{Nt-(a)-Ct} \sim \text{Nt-(b)-Ct}$$

65 donde (a) representa a la subunidad (a), (b) representa a la subunidad (b), Nt representa el extremo amino-terminal de la subunidad correspondiente, Ct representa el extremo carboxilo-terminal de la subunidad correspondiente, y \sim representa un enlace peptídico entre las diferentes unidades de la proteína de fusión de la invención.

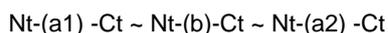
5 Cuando la unión entre las subunidades (a) y (b) de la proteína de fusión que forma la VLP de la invención se realiza mediante un polipéptido espaciador, el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal del polipéptido espaciador (p) y el aminoácido del extremo carboxilo-terminal del polipéptido espaciador forma un enlace con el aminoácido del extremo amino-terminal de la subunidad (b), tal y como se representa en el siguiente esquema:



10 donde (a) representa a la subunidad (a), (b) representa a la subunidad (b), (p) representa el polipéptido espaciador, Nt representa el extremo amino-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, Ct representa el extremo carboxilo-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, y ~ representa un enlace peptídico entre las diferentes unidades de la proteína de fusión de la invención.

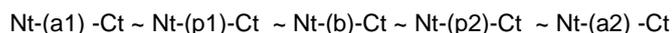
15 En este primer aspecto de la invención, la subunidad (b) puede estar alternativamente insertada en la subunidad (a) para dar lugar a la proteína de fusión que forma la VLP quimérica de la invención. La expresión "insertada" significa que la secuencia de aminoácidos de la subunidad (a) está dividida en dos partes (a1) y (a2), entre las cuales se encuentra la secuencia de aminoácidos de la subunidad (b).

20 Cuando la unión entre las subunidades (a) y (b) de la proteína de fusión que forma la VLP de la invención es directa, el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la parte (a1) de la subunidad (a) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal de la subunidad (b) y el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la subunidad (b) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal de la parte (a2) de la subunidad (a), tal y como se representa en el siguiente esquema:



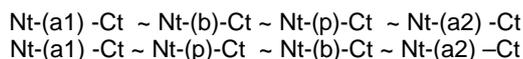
25 donde (a1) representa una parte de la subunidad (a), (a2) representa la otra parte de la subunidad (a), (b) representa a la subunidad (b), Nt representa el extremo amino-terminal de la subunidad correspondiente, Ct representa el extremo carboxilo-terminal de la subunidad correspondiente, y ~ representa un enlace peptídico entre las diferentes unidades de la proteína de fusión de la invención.

30 Cuando la unión entre las subunidades (a) y (b) de la proteína de fusión que forma la VLP de la invención se realiza mediante dos polipéptidos espaciadores, que pueden ser iguales o distintos, el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la parte (a1) de la subunidad (a) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal de un primer polipéptido espaciador (p1), el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de este primer polipéptido espaciador (p1) forma un enlace con el aminoácido del extremo amino-terminal de la subunidad (b), el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la subunidad (b) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal de un segundo polipéptido espaciador (p2) y el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de este segundo polipéptido espaciador (p2) forma un enlace con el aminoácido del extremo amino-terminal de la parte (a2) de la subunidad (a), tal y como se representa en el siguiente esquema:



35 donde (a1) representa una parte de la subunidad (a), (a2) representa la otra parte de la subunidad (a), (b) representa a la subunidad (b), (p1) representa un primer polipéptido espaciador, (p2) representa un segundo polipéptido espaciador, Nt representa el extremo amino-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, Ct representa el extremo carboxilo-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, y ~ representa un enlace peptídico entre las diferentes unidades de la proteína de fusión de la invención.

40 Cuando la unión entre las subunidades (a) y (b) de la proteína de fusión que forma la VLP de la invención se realiza mediante únicamente un polipéptido espaciador, la subunidad (b) por un extremo se encuentra unida con una de las partes de la subunidad (a) directamente mediante enlace peptídico y por el otro extremo se encuentra unida con la otra parte de la subunidad (a) mediante un polipéptido espaciador, tal y como se representa en los siguientes esquemas:



45 donde (a1) representa una parte de la subunidad (a), (a2) representa la otra parte de la subunidad (a), (b) representa a la subunidad (b), (p) representa un polipéptido espaciador, Nt representa el extremo amino-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, Ct representa el extremo carboxilo-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, y ~ representa un enlace peptídico entre las diferentes unidades de la proteína de fusión de la invención.

proteína de fusión de la invención, en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína de fusión, y el ensamblaje de dicha proteína de fusión para formar VLP quiméricas.

5 Una realización preferida de este segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de las partículas VLP quiméricas de la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión de la invención, en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína de fusión, y el ensamblaje de dicha proteína de fusión para formar VLP quiméricas, y que además comprende aislar o purificar dichas VLP quiméricas.

10 La proteína de fusión de la invención puede obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética o recombinante bien conocidas en el estado de la técnica. La secuencia de un ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión de la invención (de aquí en adelante, ácido nucleico de la descripción) puede obtenerse mediante cualquier método biológico o sintético, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la restricción de secuencias apropiadas o la amplificación de la secuencia de ADN de la proteína de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

15 El ácido nucleico puede estar comprendido en una construcción génica (de aquí en adelante, construcción génica de la descripción). Esta construcción génica de la descripción puede comprender el ácido nucleico de la descripción, operativamente unido a una secuencia reguladora de la expresión del ácido nucleico de la descripción, constituyendo de este modo un *cassette* de expresión.

20 “Unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” al ácido nucleico, está ligada al mismo de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia codificadora del ácido nucleico.

25 “Secuencia de control” se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que afectan la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Dichas secuencias de control incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de iniciación, señales de terminación, intensificadores o silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, aquellos componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

30 En una realización preferida, la construcción génica de la descripción comprende el ácido nucleico de la descripción unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- 35
- a. un promotor,
 - b. una señal de inicio de la transcripción,
 - c. una señal de terminación de la transcripción,
 - d. una señal de poliadenilación, o
 - e. un activador transcripcional.

40 Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región de ADN situada en posición 5' con respecto al punto de inicio de la transcripción y que resulta necesaria o facilita dicha transcripción en una célula animal. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

45 Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico de la descripción. En una realización particular, las secuencias de control de expresión unidas al ácido nucleico de la descripción son funcionales en células y organismos procariontes, por ejemplo, pero sin limitarse, bacterias; mientras que en otra realización particular, dichas secuencias de control de expresión son funcionales en células y organismos eucariotes, por ejemplo, células de levadura o células animales.

50 El ácido nucleico de la descripción o la construcción génica de la descripción pueden ser introducidos en el interior de una célula, denominada célula hospedadora, por ejemplo, pero sin limitarse, como ácido nucleico desnudo o mediante un vector.

55 El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

60 El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonaje adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula huésped. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

65

El término "célula hospedadora", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN.

5 Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de la VLP quimérica de la invención para la elaboración de un medicamento, preferiblemente, una vacuna.

10 Otro aspecto de la descripción se refiere al uso de la VLP quimérica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección causada por el VPH, preferiblemente, el VPH-16.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de la VLP quimérica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una neoplasia causada por el virus del papiloma humano.

15 Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de la VLP quimérica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de cérvix.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica (de aquí, en adelante, composición farmacéutica de la invención) que comprende la VLP quimérica de la invención.

20 Una realización preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la VLP quimérica de la invención y que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otra realización preferida de esta descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende la VLP quimérica de la invención y que además comprende otro principio activo. Una realización más preferida de esta descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende la VLP quimérica de la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable y además otro principio activo.

25 Como se emplea aquí, los términos "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo del ser humano u otros animales.

30 La composición farmacéutica de la invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Tales formulaciones pueden administrarse a un animal y, más preferiblemente, a un mamífero, incluyendo a un humano, por una variedad de vías, incluyendo, pero sin limitarse a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraaricular, intrasinoval, intratecal, intralesional, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular o tópica.

35 La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, edad, peso, sexo o tolerancia del animal. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéuticamente efectiva que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y del efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" o "vehículos" farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

40 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

55 **Figura 1.** Muestra las microfotografías por microscopio electrónico de barrido de partículas pseudo-virales resultantes de la expresión de las proteínas de fusión a) VP2₄₅₂-E7_{Δ1-44}; b) VP2₄₅₂(L₄₃₆↑E7_{Δ1-44}↑K₄₃₇); c) VP2₄₅₂(A₄₄₁↑E7_{Δ1-44}↑F₄₄₂); d) VP2₄₅₂(A₄₅₀↑E7_{Δ1-44}↑I₄₅₁). La línea discontinua en cada foto (izquierda, abajo) corresponde a la parte amplificada. Las barras de escala están indicadas en cada fotografía

60 **Figura 2.** Ratones C57BL/6-TgN(HLA-A2.1) tras 25 días de ser xenotransplantados subcutáneamente con células TC1/A2: (A) ratones vacunados con VLP control (VP2₄₅₂) mostrando tumores de aproximadamente 1 cm³; (B) necropsia de ratón vacunado con VLP de control (VP2₄₅₂); (C) foto representativa de ratones vacunados con VLP conteniendo secuencias de E7 y que resultan libres de tumores.

65

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1: BÚSQUEDA Y SELECCIÓN, MEDIANTE UN PROCESO DE CRIBAJE SUCESIVO, DE VLP QUIMÉRICAS A PARTIR DE FUSIONES CARBOXILO TERMINALES DE VP2 CON SECUENCIAS DE E7 DE VPH.

Con el fin de identificar partículas pseudo-virales quiméricas eficaces en el tratamiento de neoplasias originadas por VPH se generan distintas construcciones incorporando la proteína VP2 truncada en distintos puntos de su extremo carboxilo terminal y distintas secuencias de E7 de VPH. Con este fin se originan construcciones de ADN en el plásmido de expresión pESC-URA (Stratagene™) que expresan VP2 truncadas en su extremo carboxilo terminal en los aminoácidos en posición 452, 450, 449, 446, 443, 441 (VP2₄₅₂, VP2₄₅₀, VP2₄₄₉, VP2₄₄₆, VP2₄₄₃, VP2₄₄₁), e incorporando lugares de restricción *NotI* y *HindIII* en el extremo carboxilo terminal pESC-URA/ VP2₄₅₂ *NotI-HindIII*; pESC-URA/ VP2₄₅₀ *NotI-HindIII*; pESC-URA/ VP2₄₄₉ *NotI-HindIII*; pESC-URA/ VP2₄₄₆ *NotI-HindIII*; pESC-URA/ VP2₄₄₃ *NotI-HindIII*; y pESC-URA/ VP2₄₄₁ *NotI-HindIII*. Tras la doble digestión *NotI* - *HindIII* se clona en el carboxilo terminal de las distintas VP2 una secuencia expresando la proteína de E7 de VPH-16 en la que se han delecionado las secuencias de aminoácidos 1 a 35 (E7 Δ ₁₋₃₅) asociadas a su oncogenicidad. Tal y como se presenta en la Tabla 1, la capacidad de producir VLP en *Saccharomyces cerevisiae* Y449 transformada con los distintos vectores de expresión resultantes, pESC-URA/ VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₃₅ para expresar la proteína de fusión VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₃₅ [SEQ ID NO: 5], pESC-URA/ VP2₄₅₀-E7 Δ ₁₋₃₅ para expresar la proteína de fusión VP2₄₅₀-E7 Δ ₁₋₃₅ [SEQ ID NO: 11], pESC-URA/ VP2₄₄₉-E7 Δ ₁₋₃₅ para expresar la proteína de fusión VP2₄₄₉-E7 Δ ₁₋₃₅ [SEQ ID NO: 12], pESC-URA/ VP2₄₄₆-E7 Δ ₁₋₃₅ para expresar la proteína de fusión VP2₄₄₆-E7 Δ ₁₋₃₅ [SEQ ID NO: 13], pESC-URA/ VP2₄₄₃-E7 Δ ₁₋₃₅ para expresar la proteína de fusión VP2₄₄₃-E7 Δ ₁₋₃₅ [SEQ ID NO: 14], pESC-URA/ VP2₄₄₁-E7 Δ ₁₋₃₅ para expresar la proteína de fusión VP2₄₄₁-E7 Δ ₁₋₃₅ [SEQ ID NO: 15], se compara con la de pESC-URA/ VP2₄₅₂ para expresar la proteína VP2₄₅₂ [SEQ ID NO: 4]. Como parte del mismo experimento también se generan fusiones al carboxilo terminal de VP2₄₅₂ a partir de la doble digestión *NotI* - *HindIII* de pESC-URA/ VP2₄₅₂ *NotI-HindIII* y clonaje de distintas secuencias expresando la proteína de E7 de VPH-16 en la que se han eliminado los aminoácidos 1-40 (E7 Δ ₁₋₄₀) para expresar la proteína de fusión VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₄₀ [SEQ ID NO: 16], los aminoácidos 1-41 (VPH16 E7 Δ ₁₋₄₁) para expresar la proteína de fusión VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₄₁ [SEQ ID NO: 17], y los aminoácidos 1-44 (VPH16 E7 Δ ₁₋₄₄) para expresar la proteína de fusión VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₄₄ [SEQ ID NO: 7]. Tal y como se presenta en la Tabla 1, la capacidad de producir VLP en *S. cerevisiae* Y449 transformada con los distintos vectores de expresión resultantes, pESC-URA/ VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₄₀, pESC-URA/ VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₄₁ o pESC-URA/ VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₄₄ se compara con la de pESC-URA/ VP2₄₅₂ *NotI-HindIII*. La capacidad de las distintas construcciones de producir VLP se determina mediante el uso de un anticuerpo conformacional que reconoce la estructura tridimensional de la VLP y posteriormente analizado mediante un inmunoensayo del tipo ELISA. Asimismo, la producción y purificación de las VLP quiméricas y VLP control para estudios morfológicos y para ensayos *in vivo* se lleva a cabo siguiendo un procedimiento estándar de cultivo de las levaduras durante 48 horas, concentración mediante centrifugado, lisado mecánico, precipitación en sulfato amónico, purificación mediante cromatografía de filtración por gel. En todos los casos se confirma la presencia de VLP mediante microscopía electrónica y se cuantifican las VLP quiméricas producidas mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

El rendimiento en la producción de las VLP quiméricas evaluadas se recoge en la Tabla 1. Como siguiente paso en el proceso de selección se evalúa la capacidad de inducir una respuesta inmune de las VLP resultantes de la expresión de las construcciones con una eficiencia en la producción de VLP comparable o superior al control VP2₄₅₂-E7 Δ ₁₋₃₅. Brevemente, el ensayo ELISPOT está dirigido a medir la inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) en un modelo de ratón. Para ello se utilizan ratones transgénicos C57BL/6-TgN(HLA-A2.1)1Enge/J humanizados con el complejo de histocompatibilidad HLA-A2. Los ratones se inmunizan en grupos de ocho mediante administración subcutánea de las VLP quiméricas los días 0 y 14. En el día 20 se sacrifican los animales, se extraen los bazo y se aíslan los esplenocitos. Una vez aislados, los esplenocitos se cultivan en presencia de IL-2 y posteriormente se estimulan con péptidos específicos (epítomos T) de la proteína E7 del VPH-16 durante 24 horas. Tras la incubación, se evalúa la expresión de IFN- γ de los clones de CTLs como medida de su activación. La capacidad de inducir una respuesta CTL específica contra epítomos T de la proteína E7 del VPH-16 de cada una de las VLP quiméricas evaluadas, se recoge en la Tabla 1 donde el número de "+" representa la intensidad de la respuesta inducida.

Como último paso en el proceso de selección, se evalúa la actividad antitumoral de las VLP quiméricas con los valores más altos de rendimiento en la producción de VLP y los mejores resultados en el ensayo de ELISPOT. Para la evaluación de la actividad antitumoral se utiliza un modelo celular y animal de inducción de tumores en el que 5x10⁵ células TC1/A2 [según Peng S. *et al.* Gene Therapy, 13:257-265 (2006)] sobre-expresando las antígenos tumorales E6 y E7 del VPH-16 se implantan subcutáneamente en los ratones C57BL/6-TgN(HLA-A2.1)1Enge/J humanizados con el complejo de histocompatibilidad HLA-A2. Los animales se agrupan en grupos de diez y a cada

animal se administran 50 ug de las VLP quiméricas o controles mediante administración subcutánea a los 5 y 12 días después de la inducción del tumor. Periódicamente se determina el desarrollo del tumor y monitoriza el peso de los animales. Los animales con tumores con un volumen superior de 1cm³ se sacrifican. El efecto terapéutico de las VLP quiméricas en el modelo tumoral TC1/A2 se recoge en la Tabla 1 donde figura el porcentaje de animales que sobreviven 60 días después de la inducción del tumor.

Como resultado final de este proceso se selecciona la VLP quimérica conteniendo la construcción VP2₄₅₂-E7_{Δ1-44}, en la que la secuencia de E7 truncada E7_{Δ1-44} está fusionada al extremo carboxilo terminal de VP2 en la Arginina (R) de la posición 452.

Tabla 1

Clon	Identificación	% VLP	ELISPOT	Efecto antitumoral % de supervivencia
1	VP2 ₄₅₂ -E7 _{Δ1-35}	20 %	+++	80 %
2	VP2 ₄₅₀ -E7 _{Δ1-35}	16 %	ND	ND
3	VP2 ₄₄₉ -E7 _{Δ1-35}	20 %	+++	ND
4	VP2 ₄₄₆ -E7 _{Δ1-35}	14 %	ND	ND
5	VP2 ₄₄₃ -E7 _{Δ1-35}	8 %	ND	ND
6	VP2 ₄₄₁ -E7 _{Δ1-35}	16 %	++	ND
7	VP2 ₄₅₂ -E7 _{Δ1-40}	25 %	+++	ND
8	VP2 ₄₅₂ -E7 _{Δ1-41}	25 %	+++	ND
9	VP2 ₄₅₂ -E7 _{Δ1-44}	40 %	++++	100 %
10	VP2 ₄₅₂	100 %	-	0 %

%VLP: Rendimiento en la producción de VLP comparado con VP2₄₅₂; ND: No determinado.

EJEMPLO 2: CLONAJE, BÚSQUEDA Y SELECCIÓN, MEDIANTE UN PROCESO DE CRIBAJE SUCESIVO, DE VLP QUIMÉRICAS CON EFICACIA TERAPÉUTICA CONTRA NEOPLASIAS CAUSADAS POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

En un primer paso, se lleva a cabo un proceso de inserción al azar en el gen de la VP2 de secuencias que codifican regiones no transformantes de E7 en las que se ha deleciónado los aminoácidos 1 a 44 (E7_{Δ1-44}). Para esto se elabora una librería de VP2 truncada en el extremo carboxilo a partir del aminoácido 452 (VP2₄₅₂) que contiene inserciones al azar del transposón Mu en toda su secuencia. En un paso siguiente se reemplaza el inserto del transposón Mu por un inserto [SEQ ID NO: 18] que contiene el gen de la resistencia a kanamicina y lugares de restricción únicos *NotI* y *SpeI* en sus extremos. El inserto clonado facilita la incorporación de los insertos E7_{Δ1-44} [SEQ ID NO: 19] o E7_{Δ1-44}(linker) [SEQ ID NO: 20] de VPH-16 sintetizadas para contener extremos *Bsp120I* (compatible con *NotI*) y *SpeI* para su clonaje en cada uno de los tres posibles marcos de lectura. La fusión de los insertos E7_{Δ1-44} o E7_{Δ1-44}(linker) genera aminoácidos adicionales en el punto de fusión entre VP2₄₅₂ y E7_{Δ1-44}. El inserto E7_{Δ1-44}(linker) contiene además las secuencias GGGGS [SEQ ID NO: 21] en los dos extremos de E7_{Δ1-44} que se han introducido para aumentar la flexibilidad de la inserción (en inglés "linkers").

Tras la doble digestión de la librería con *NotI* y *SpeI* y el ligado en presencia de los fragmentos con extremos *Bsp120I* y *SpeI* de E7_{Δ1-44} ó E7_{Δ1-44}(linker), se transforman células electro-competentes de *E.coli* para obtener una librería de VP2₄₅₂ conteniendo inserciones al azar de E7_{Δ1-44}. La librería se expande y 10 ug del ADN obtenido de la misma se usan para transformar *S.cerevisiae* Y449 que luego se siembra sobre placas Petri conteniendo el medio YNB/CSM-URA con 2% de glucosa. Los aproximadamente 10.000 clones obtenidos se transfieren a placas Petri de selección conteniendo galactosa. Las colonias obtenidas de la selección se transfieren a membranas de PVDF para la identificación mediante inmunoblot en colonia de aquellas que expresan VP2 y E7.

En un segundo paso se lleva a cabo un proceso de selección de los clones de levadura recombinante cuyo rendimiento en la producción de VLP es eficaz y que contienen E7_{Δ1-44}. Para esto se preparan cultivos en condiciones de expresión de cincuenta clones con las señales mas altas en el inmunoblot en colonia contra VP2 y E7 y tras 48 horas de incubación se elaboran extractos de proteína en los que la cantidad de VLP se cuantifica mediante un ensayo tipo ELISA que incorpora un anticuerpo que reconoce de forma específica la estructura

tridimensional de la VLP formada por VP2. En este primer cribaje se seleccionan aquellas construcciones con los rendimientos más altos en la producción de VLP. La presencia de la secuencia completa de E7_{Δ1-44} y su lugar de inserción se verifica mediante secuenciación de un extracto de ADN de cada una de los clones seleccionados. Tal y como se recoge en la Tabla 2, de este modo se identifican 12 clones expresando VLP de VP2₄₅₂ conteniendo el inserto E7_{Δ1-44} y con un rendimiento en la producción comparado con la VLP control de (VP2₄₅₂), de entre un 6 y un 20%.

Asimismo, la producción y purificación de las VLP quiméricas y VLP control para estudios morfológicos y para ensayos *in vivo* se lleva a cabo siguiendo un procedimiento estándar de cultivo de las levaduras durante 48 horas, concentración mediante centrifugado, lisado mecánico, precipitación en sulfato amónico, purificación mediante cromatografía de filtración por gel. En todos los casos se confirma la presencia de VLP mediante microscopia electrónica y se cuantifican las VLP quiméricas producidas mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

En un tercer paso se seleccionan las VLP quiméricas que generan una respuesta inmune significativa contra E7. Para esto se evalúa la capacidad de inducir una respuesta inmune de las VLP quiméricas originadas por aquellas construcciones cuyo rendimiento en la producción más alto. Brevemente, el ensayo ELISPOT está dirigido a medir la inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) en un modelo de ratón. Para ello se utilizan ratones transgénicos C57BL/6-TgN(HLA-A2.1)1Enge/J "humanizados" con el complejo de histocompatibilidad HLA-A2. Los ratones se inmunizan en grupos de ocho mediante administración subcutánea de las VLP quiméricas los días 0 y 14. En el día 20 se sacrifican los animales, se extraen los bazo y se aíslan los esplenocitos. Una vez aislados, los esplenocitos se cultivan en presencia de IL-2 y posteriormente se estimulan con péptidos específicos (epítotos T) de la proteína E7 del VPH-16 durante 24 horas. Tras la incubación, se evalúa la expresión de IFN- γ de los clones de CTL como medida de su activación. La capacidad de inducir una respuesta CTL específica contra epítotos de la proteína E7 del VPH-16 de cada una de las VLP quiméricas evaluadas se recoge en la Tabla 1 donde el número de "+" representa la intensidad de la respuesta inducida.

En un cuarto paso en el proceso de selección se evalúa la actividad antitumoral de las VLP quiméricas con los valores más altos de rendimiento en la producción de VLP y los mejores resultados en el ensayo de ELISPOT. Para la evaluación de la actividad antitumoral se utiliza un modelo celular y animal de inducción de tumores en el que 5x10⁵ células TC1/A2 [según Peng S. *et al.* Gene Therapy, 13:257-265 (2006)] sobre-expresando los antígenos tumorales E6 y E7 del VPH-16, se implantan subcutáneamente en los ratones C57BL/6-TgN(HLA-A2.1)1Enge/J humanizados con el complejo de histocompatibilidad HLA-A2. Los animales se agrupan en grupos de ocho y a cada animal se le administran 50 ug de las VLP quiméricas o controles, mediante administración subcutánea a los 5 y 12 días después de la inducción del tumor. Periódicamente se determina el desarrollo del tumor y monitoriza el peso de los animales. Los animales con tumores con un volumen superior de 1cm³ se sacrifican. El efecto terapéutico de las VLP quiméricas en el modelo tumoral TC1/A2 se recoge en la Tabla 2 donde figura el porcentaje de animales que sobreviven 60 días después de la inducción del tumor.

Como resultado final de este proceso se seleccionan tres VLP quiméricas objeto de la presente invención, esto es:

- VP2₄₅₂(L₄₃₆↑E7_{Δ1-44}↑K₄₃₇) [SEQ ID NO: 8]: VLP quimérica en la que la secuencia de E7_{Δ1-44} está insertada entre la Leucina en la posición 436 y la Lisina en la posición 437 de la VP2 de 452 aminoácidos de longitud;
- VP2₄₅₂(A₄₄₁↑E7_{Δ1-44}↑F₄₄₂) [SEQ ID NO: 9]: VLP quimérica en la que la secuencia de E7_{Δ1-44} está insertada entre la Alanina en la posición 441 y la Fenilalanina en la posición 442 de la VP2 de 452 aminoácidos de longitud; y
- VP2₄₅₂(A₄₅₀↑E7_{Δ1-44}↑I₄₅₁) [SEQ ID NO: 10]: VLP quimérica en la que la secuencia de E7_{Δ1-44} está insertada entre la Alanina en la posición 450 y la Isoleucina en la posición 451 de la VP2 de 452 aminoácidos de longitud.

Tabla 2

Clon	Identificación	% VLP	Resultado ELISPOT	Efecto antitumoral % de supervivencia
1	VP2 ₄₅₂ (Q ₁₀ ↑E7 _{Δ1-44} ↑I ₁₁)	10 %	+++	60 %
2	VP2 ₄₅₂ (D ₅₁ ↑E7 _{Δ1-44} ↑T ₅₂)	6 %	ND	ND
3	VP2 ₄₅₂ (T ₇₃ ↑E7 _{Δ1-44} ↑L ₇₄)	6 %	ND	ND
4	VP2 ₄₅₂ (A ₃₈₀ ↑E7 _{Δ1-44} ↑K ₃₈₀)	8 %	ND	ND
5	VP2 ₄₅₂ (L ₄₃₆ ↑E7 _{Δ1-44} ↑K ₄₃₇)	10 %	+++++	100 %
6	VP2 ₄₅₂ (A ₄₄₁ ↑E7 _{Δ1-44} ↑F ₄₄₂)	20 %	+++++	100 %
7	VP2 ₄₅₂ (A ₄₅₀ ↑E7 _{Δ1-44} ↑I ₄₅₁)	18 %	+++++	100 %

ES 2 667 052 T3

8	VP2 ₄₅₂ -E7 _{Δ1-44}	40 %	+++++	100 %
9	VP2 ₄₅₂	100 %	-	0 %

%VLP: Rendimiento en la producción de VLP comparado con VP2₄₅₂; ND: No determinado.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> CHIMERA PHARMA S.L.

<120> VACUNAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS A PARTIR DE CÁPSIDES
VIRALES DE BIRNAVIRUS CONTENIENDO ANTIGENOS DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO

10 <130> EP2214.2

<150> P200930967

<151> 2009-11-06

15 <160> 21

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> pVP2 de IBDV cepa Soroa

<400> 1

30 Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
20 25 30

35 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
35 40 45

ES 2 667 052 T3

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
5 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
85 90 95

10 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
115 120 125

15 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
20 145 150 155 160

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
165 170 175

25 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
195 200 205

30 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
35 225 230 235 240

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
245 250 255

ES 2 667 052 T3

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

5 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300

10 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

15 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 20 355 360 365

Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380

25 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

30 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 35 435 440 445

Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Val Ser Thr Leu Phe Pro
 450 455 460

ES 2 667 052 T3

Lys Pro

<210> 3

<211> 63

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> E7 de VPH-16 en la que se le han eliminado los aminoácidos 1 a 35

<400> 3

Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His
1 5 10 15

15

Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu
20 25 30

20

Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu
35 40 45

25

Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
50 55 60

<210> 4

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> pVP2 de IBDV cepa Soroa truncada en su extremo carboxilo terminal
en la posición 452

<400> 4

35

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
1 5 10 15

ES 2 667 052 T3

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 5 35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

10 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

15 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 20 115 120 125

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

25 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

30 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 35 195 200 205

Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

ES 2 667 052 T3

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 5 245 250 255
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270
 10 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285
 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300
 15 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 20 325 330 335
 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350
 25 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365
 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380
 30 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 35 405 410 415
 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

ES 2 667 052 T3

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Ile Arg
 5 450

<210> 5

<211> 518

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

15 <400> 5

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

20 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

25 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

30 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

35 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

ES 2 667 052 T3

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

ES 2 667 052 T3

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

5 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365

10 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380

Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 15 385 390 395 400

Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

20 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445

25 Arg Ala Ile Arg Arg Pro Arg Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln
 450 455 460

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys
 30 465 470 475 480

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile
 485 490 495

35 Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro
 500 505 510

ES 2 667 052 T3

Ile Cys Ser Gln Lys Pro

515

<210> 6

5 <211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> E7 de VPH-16 en la que se le han eliminado los aminoácidos 1 a 44

<400> 6

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys

15 1 5 10 15

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile

20 20 25 30

20 Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro

35 40 45

Ile Cys Ser Gln Lys Pro

50

25

<210> 7

<211> 509

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 7

35

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg

1 5 10 15

ES 2 667 052 T3

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 5 35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

10 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

15 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 20 115 120 125

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

25 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

30 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 35 195 200 205

Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

ES 2 667 052 T3

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240

5 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

10 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 15 290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320

20 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

25 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365

Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 30 370 375 380

Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

35 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

ES 2 667 052 T3

Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

5 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Ile Arg Arg Pro Arg Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn
 450 455 460

10 Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val
 465 470 475 480

Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly
 485 490 495

15 Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 500 505

<210> 8

20 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Proteína de fusión

<400> 8

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 30 1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

35 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

ES 2 667 052 T3

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
5 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
85 90 95

10 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
115 120 125

15 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
20 145 150 155 160

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
165 170 175

25 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
195 200 205

30 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
35 225 230 235 240

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
245 250 255

ES 2 667 052 T3

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

5 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300

10 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

15 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 20 355 360 365

Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380

25 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

30 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

Asn Ser Pro Leu Met Arg Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Asp
 35 435 440 445

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 450 455 460

ES 2 667 052 T3

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 465 470 475 480

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 5 485 490 495

Lys Pro Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Gly Pro His Leu Lys Ile Ala
 500 505 510

10 Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile Arg Ala Ile Arg
 515 520 525

<210> 9
 <211> 515

15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión

20 <400> 9

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

25 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 30 35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

35 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

ES 2 667 052 T3

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

ES 2 667 052 T3

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 5 305 310 315 320
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335
 10 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365
 15 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 20 385 390 395 400
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415
 25 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Leu Arg Pro Ala Glu Pro Asp
 435 440 445
 30 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 450 455 460
 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 35 465 470 475 480
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 485 490 495

ES 2 667 052 T3

Lys Pro Thr Ser Gly Pro Gln Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile Arg
 500 505 510

Ala Ile Arg
 5 515

<210> 10

<211> 515

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

15 <400> 10

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

20 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

25 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

30 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

35 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

ES 2 667 052 T3

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

ES 2 667 052 T3

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

5 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365

10 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380

Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

15 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 20 420 425 430

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445

25 Arg Ala Met Arg Pro Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val
 450 455 460

Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser
 465 470 475 480

30 Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu
 485 490 495

Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Thr Ser Gly Pro Gln
 35 500 505 510

Ala Ile Arg
 515

ES 2 667 052 T3

<210> 11
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión

<400> 11

10

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

20

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

25

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

30

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125

35

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

ES 2 667 052 T3

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
145 150 155 160

5 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
165 170 175

Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
180 185 190

10 Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
195 200 205

Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
210 215 220

15 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
225 230 235 240

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
20 245 250 255

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
260 265 270

25 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
275 280 285

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
290 295 300

30 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
305 310 315 320

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
35 325 330 335

Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
340 345 350

ES 2 667 052 T3

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365

5 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380

Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

10 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

15 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Arg Pro Arg Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu
 20 450 455 460

Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp
 465 470 475 480

25 Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr
 485 490 495

Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
 500 505 510

30 Ser Gln Lys Pro
 515

<210> 12

35 <211> 515
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 667 052 T3

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 12

5

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
1 5 10 15

10

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
35 40 45

15

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
50 55 60

20

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
85 90 95

25

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
115 120 125

30

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
145 150 155 160

35

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
165 170 175

ES 2 667 052 T3

Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

5 Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205

Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

10 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 15 245 250 255

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

20 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 25 290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 30 325 330 335

Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

35 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365

ES 2 667 052 T3

Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380

5 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

10 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445

15 Arg Arg Pro Arg Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro
 450 455 460

Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser
 20 465 470 475 480

Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu
 485 490 495

25 Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser
 500 505 510

Gln Lys Pro
 515

30 <210> 13
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Proteína de fusión

ES 2 667 052 T3

<400> 13

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

5 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

10 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

15 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

20 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

25 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

30 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

35 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

ES 2 667 052 T3

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205

5 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240

10 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

15 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 20 290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320

25 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

30 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365

Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 35 370 375 380

Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

ES 2 667 052 T3

Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

5 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Arg Pro
 435 440 445

10 Arg Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala
 450 455 460

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg
 15 465 470 475 480

Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu
 485 490 495

20 Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 500 505 510

<210> 14
 <211> 509

25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión

30 <400> 14

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

35 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

ES 2 667 052 T3

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

ES 2 667 052 T3

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
245 250 255

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
5 260 265 270

Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
275 280 285

10 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
305 310 315 320

15 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
325 330 335

Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
20 340 345 350

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
355 360 365

25 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
370 375 380

Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
385 390 395 400

30 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
405 410 415

Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
35 420 425 430

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Arg Pro Arg Asp Glu
435 440 445

ES 2 667 052 T3

Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn
 450 455 460

Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val
 5 465 470 475 480

Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly
 485 490 495

10 Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 500 505

<210> 15
 <211> 507
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión

20 <400> 15

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

25 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 30 35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

35 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

ES 2 667 052 T3

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

ES 2 667 052 T3

Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 5 305 310 315 320
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335
 10 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365
 15 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 20 385 390 395 400
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415
 25 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Arg Pro Arg Asp Glu Ile Asp
 435 440 445
 30 Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val
 450 455 460
 Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser
 35 465 470 475 480
 Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu
 485 490 495

ES 2 667 052 T3

Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 500 505

- <210> 16
- 5 <211> 513
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Proteína de fusión
- <400> 16

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 15 1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 25 35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 25 65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 30 85 90 95

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 35 115 120 125

ES 2 667 052 T3

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 5 145 150 155 160

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

10 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205

15 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 20 225 230 235 240

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255

25 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

30 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 35 305 310 315 320

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

ES 2 667 052 T3

Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
340 345 350

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
5 355 360 365

Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
370 375 380

10 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
385 390 395 400

Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
15 405 410 415

Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
420 425 430

Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
20 435 440 445

Arg Ala Ile Arg Arg Pro Arg Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg
450 455 460

25 Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu
465 470 475 480

Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp
30 485 490 495

Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys
500 505 510

Pro
35

<210> 17
<211> 512

ES 2 667 052 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Proteína de fusión

<400> 17

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
10 1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
15 35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
50 55 60

20 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
25 85 90 95

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
100 105 110

30 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
115 120 125

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
130 135 140

35 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
145 150 155 160

ES 2 667 052 T3

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

5 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205

10 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 15 225 230 235 240

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255

20 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

25 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 30 305 310 315 320

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335

35 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350

ES 2 667 052 T3

Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365

5 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380

Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400

10 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415

Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430

15 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Ile Arg Arg Pro Arg Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala
 20 450 455 460

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg
 465 470 475 480

25 Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu
 485 490 495

Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 500 505 510

30

<210> 18
 <211> 1151
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de ADN del inserto de clonación que contiene el gen de
 la resistencia a kanamicina y lugares de restricción únicos

ES 2 667 052 T3

NotI y SpeI y el sito de restricción único Bsp 120I.

```

<400> 18
gactgcggcc gccctatcgt caattattac ctccacgggg agagcctgag caaactggcc      60
5
tcaggcattt gagaagcaca cggtcacact gtttccggta gtcaataaac cggtaaacca      120
gcaatagaca taagcggcta tttaacgacc ctgccctgaa cgcacgaccg ggtcgaattt      180
10
gctttcgaat ttctgccatt catccgctta ttatcactta ttcaggcgta gcaaccaggc      240
gtttaagggc accaataact gccttaaaaa aattacgccc cgccttgcca ctcatcgcag      300
tactgttgta attcattaag cattctgccg acatggaagc catcaciaac ggcgatgatga      360
15
acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgcg tataatattt gcccatggtg      420
aaaacggggg cgaagaagtt gtccatattg gccacgttta aatcaaaact ggtgaaactc      480
20
accaggggat tggctgagac gaaaaacata ttctcaataa accctttagg gaaataggcc      540
aggttttcac cgtaacacgc cacatcttgc gaatatatgt gtagaaactg ccggaaatcg      600
tcgtggtatt cactccagag cgatgaaaac gtttcagttt gctcatggaa aacgggtgtaa      660
25
caagggtgaa cactatccca taccaccagc tcaccgtctt tcattgccat acgtaattcc      720
ggatgagcat tcatcaggcg ggcaagaatg tgaataaagg ccgataaaa cttgtgctta      780
30
tttttcttta cggctctttaa aaaggccgta atatccagct gaacggctctg gttataggta      840
cattgagcaa ctgactgaaa tgcctcaaaa tgttctttac gatgccattg ggatatatca      900
acggtggtat atccagtgat ttttttctcc attttagctt ccttagctcc tgaaaatctc      960
35
gacaactcaa aaaatacgcc cggtagtgat cttatttcat tatggtgaaa gttggaacct      1020
cttacgtgcc gatcaacgtc tcattttcgc caaaagttgg cccagggctt cccgggatca      1080

```

ES 2 667 052 T3

acagggacac caggatttat ttattctgcg aagtgatcctt ccgtcacagg tatttactag 1140

tgggcccagt c 1151

5

<210> 19
 <211> 180
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencias de ADN del inserto que codifica E7 de VPH-16 en la que
 se le ha eliminado los aminoácidos 1 al 44, y presenta en sus
 15 extremos los lugares de restricción unicos Bsp 120I y SpeI

<400> 19
 ccagggcccg ctgaaccaga tagagcccat tacaacattg tcacattctg ttgtaaagt 60

20 gattcaacat tgagattatg tgttcaatct acccatggtg atattagaac attagaagat 120

ttgttaatgg gtacattagg tattgtttgt ccaatttgct cacaaaaacc tactagtgg 180

25 <210> 20
 <211> 211
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencias de ADN del inserto que codifica E7 de VPH-16 en la que
 se le ha eliminado los aminoácidos 1 al 44 y el polipeptido
 espaciador, y presenta en sus extremos los lugares de restricción
 únicos Bsp 120I y SpeI.
 35

<400> 20
 ccagggcccg gtggtggagg ttcagctgaa ccagatagag cccattacaa cattgtcaca 60

ES 2 667 052 T3

ttctgttgta aatgtgattc aacattgaga ttatgtgttc aatctacca tgttgatatt 120
agaacattag aagatttggt aatgggtaca ttaggtattg ttgtccaat ttgtcaciaa 180
5 aaacctggag gaggtggatc aactagtggc c 211

<210> 21
<211> 5
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia del espaciador
15

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
20

REIVINDICACIONES

1. Partícula pseudo-viral quimérica (VLP) formada por una proteína de fusión que comprende:
 - una subunidad (a) que consiste en el fragmento de proteína pVP2 de IBDV VP2₄₅₂ de SEQ ID NO: 4, y
 - una subunidad (b) que consiste en la SEQ ID NO: 6,
 donde la subunidad (b) está unida al extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) o la subunidad (b) está insertada en la subunidad (a).
2. Partícula pseudo-viral quimérica según la reivindicación 1, donde la subunidad (b) está unida al extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) mediante un polipéptido espaciador de hasta 10 aminoácidos situado entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades (a) y (b).
3. Partícula pseudo-viral quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la SEQ ID NO: 6 está unida al R₄₅₂ de la SEQ ID NO: 4.
4. Partícula pseudo-viral quimérica según la reivindicación 3, donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 7.
5. Partícula pseudo-viral quimérica según la reivindicación 1, caracterizada por que cuando la subunidad (b) está insertada en la subunidad (a) la proteína de fusión además comprende uno o dos polipéptidos espaciadores de hasta 15 aminoácidos situados entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad (b) y la secuencia de aminoácidos de la subunidad (a).
6. Partícula pseudo-viral quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, donde la SEQ ID NO: 6 está insertada entre los aminoácidos L₄₃₆ y K₄₃₇ de la SEQ ID NO: 4.
7. Partícula pseudo-viral quimérica según la reivindicación 6, donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 8.
8. Partícula pseudo-viral quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, donde la SEQ ID NO: 6 está insertada entre los aminoácidos A₄₄₁ y F₄₄₂ de la SEQ ID NO: 4.
9. Partícula pseudo-viral quimérica según la reivindicación 8, donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 9.
10. Partícula pseudo-viral quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, donde la SEQ ID NO: 6 está insertada entre los aminoácidos A₄₅₀ y I₄₅₁ de la SEQ ID NO: 4.
11. Partícula pseudo-viral quimérica según la reivindicación 10, donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 10.
12. Procedimiento para la obtención de partículas pseudo-virales quiméricas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína de fusión, y el ensamblaje de dicha proteína de fusión para formar partículas pseudo-virales quiméricas.
13. Procedimiento para la obtención de partículas pseudo-virales quiméricas según la reivindicación anterior, y que además comprende aislar o purificar dichas partículas pseudo-virales quiméricas.
14. Uso de la partícula pseudo-viral quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la elaboración de un medicamento.
15. Uso de la partícula pseudo-viral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una neoplasia causada por el virus del papiloma humano.
16. Uso de la partícula pseudo-viral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de cérvix.
17. Composición farmacéutica que comprende la partícula pseudo-viral quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

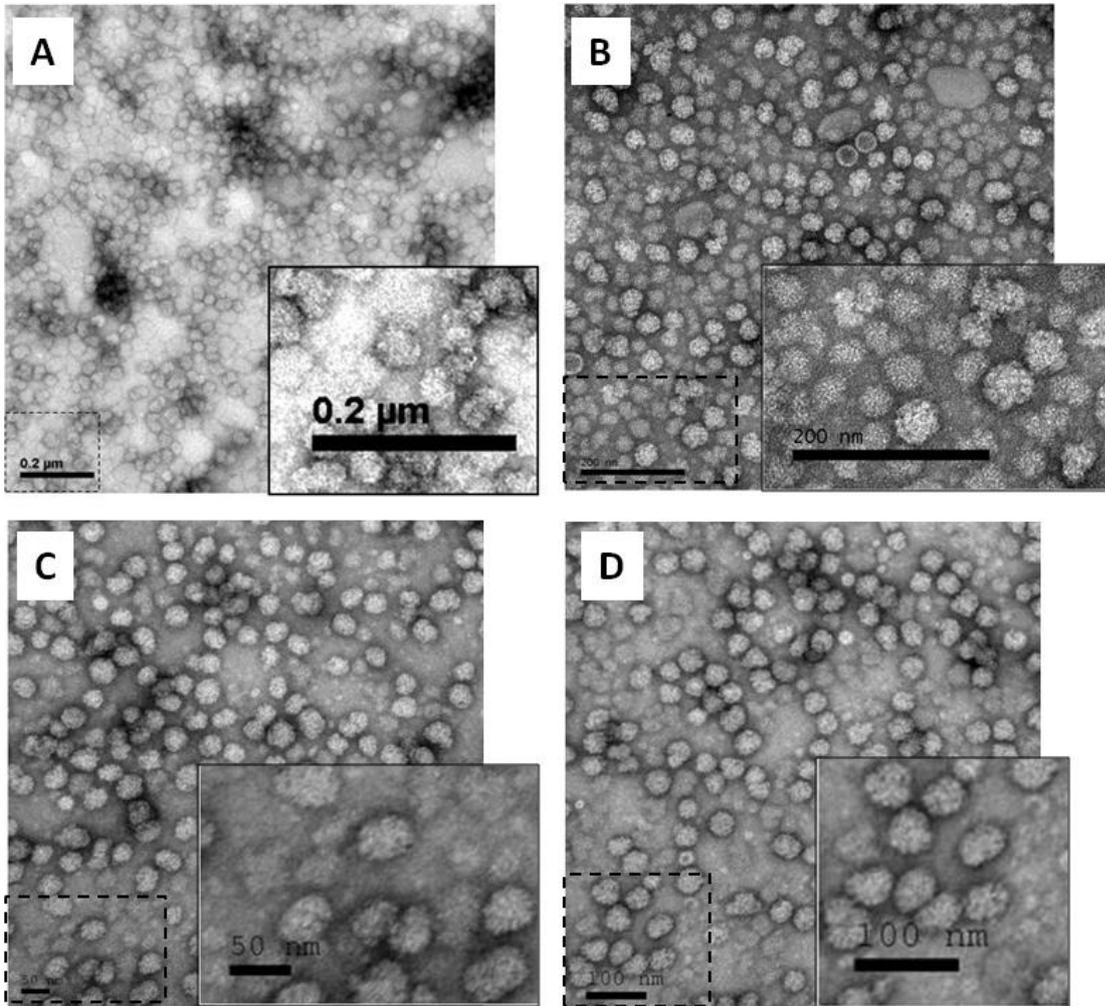


Figura 2

