



DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____

DOMICILIO _____

74. APODERADO _____

22. BOGOTÁ, D. C., _____

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-001297- -00000-0000

Fecha: 2012-01-04 16:29:27
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 207

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre : **GLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A.**

Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá,
Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BAUDOX, Guy Jean Marie Fernand Pierre; COLAU, Brigitte Desiree Alberte;
DENDOUGA, Najoua; GIANNINI, Sandra y LECRENIER, Nicolas Pierre, Fernand.

Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart y
GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Parc de la Noire Epine, rue Fleming 20, B-1300 Wavre.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/059024

Fecha: 24/06/10

Publicación Internacional No. WO 2010/ 149752 A3

Fecha: 29/12/10

⑥

Título (54) "CONSTRUCCIONES NOVEDOSAS DE PROTEÍNA DEL VIRUS DE PAPILOMA
HUMANO (HPV) Y SU USO EN LA PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD POR
EL HPV"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/12

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

25-06-09

61/220,358

US

04-09-09

61/239,880

US

08-04-10

61/322,102

⑨

Comprobante de Pago No. 11-111115 y 12-000058

Fecha: 15-11-2011 y 02-01-2012

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación, Documento solicitando corrección del nombre del solicitante (Forma 306), opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y dibujos.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquéen T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 111115
		Bogotá D.C., Noviembre 15 de 2011 - 14:33:08

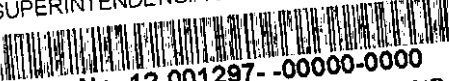
RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.	NI 830.022.145
-----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415004634	15/11/2011	20.124.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de-Gaja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-001297- -00000-0000
Fecha: 2012-01-04 16:29:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 207

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000058
		Bogotá D.C., Enero 02 de 2012 - 11:32:58

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.	NI 830.022.145
-----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	456035484	02/01/2011	7.160.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	19.000.00
				19.000.00
				\$19.000.00
				=====

SON: **DIECINUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

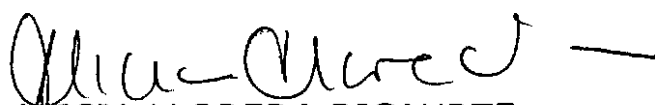
Responsable: _____
Resibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-001297- -00000-0000
Fecha: 2012-01-04 16:29:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 207

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ÁLVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

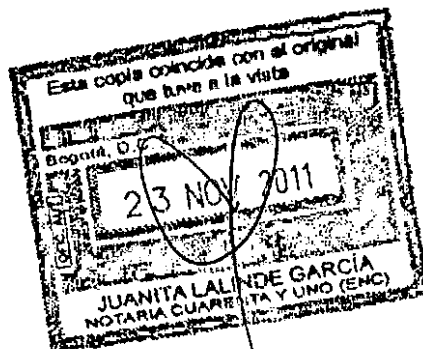
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



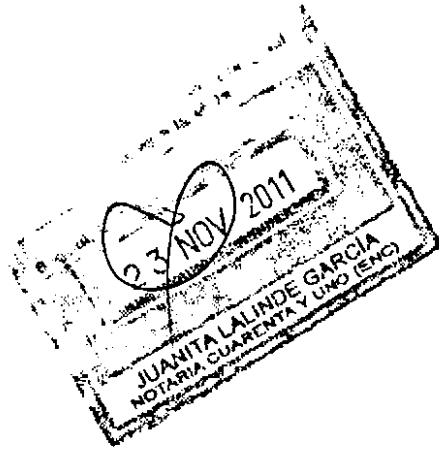
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567
A nita Escobar
Cuya firma aparece en el
documento de empeña
las funciones indicadas

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

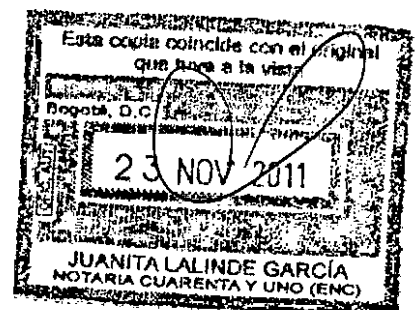
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

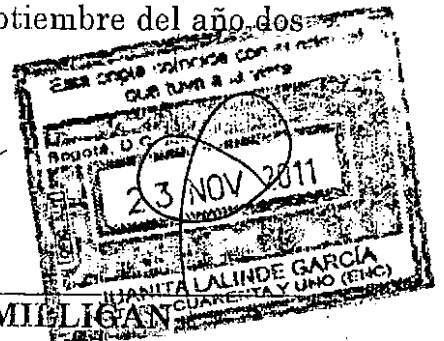
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



SCOTT
NOTARIES

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octob

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by a été signé par James Keef Milligan
3. acting in the capacity of agissant en qualité de Notary Public
4. bears the seal/stamp of est revêtu du sceau/timbre de Notary Public

Certified/Attesté

5. at London/à Londres
6. the/le 01 SEP 2004
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth

8. Number/sous No G 749037

9. Stamp:
timbre:

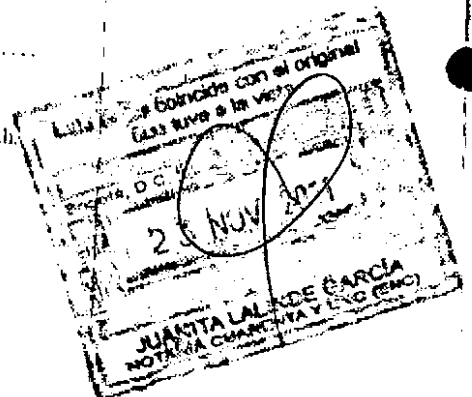


10. Signature: W GLASS

W Glass

For the Secretary of State/Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.



LL
SA
sol
pro
pod
nue
Dad

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al párrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

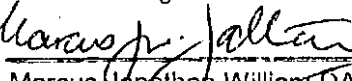
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

(19)

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at

, under date of and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/12	
(22) Fecha de solicitud: 04-01-12		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/220,358	25-06-09	US
	61/239,880	04-09-09	US
	61/322,102	08-04-10	US
		(72) Inventor(es): BAUDOX, Guy Jean Marie Fernand Pierre; COLAU, Brigitte Desiree Alberte; DENDOUGA, Najoua; GIANNINI, Sandra y LECRENIER, Nicolas Pierre, Fernand.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 25-01-12	(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 29-12-10	
	Fecha de presentación de la solicitud: 24-06-10	No. publicación: WO 2010/149752 A3	
	No. de solicitud: PCT/EP2010/059024		
(54) Título: " CONSTRUCCIONES NOVEDOSAS DE PROTEÍNA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV) Y SU USO EN LA PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD POR EL HPV"			

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.- La divulgación proporciona construcciones novedosas de proteína del virus de papiloma humano (HPV) y su uso en la prevención de la enfermedad por el HPV. Las construcciones son proteínas quiméricas que comprenden proteínas L1 con un péptido L2 de HPV insertado en la proteína L1. Estas proteínas quiméricas se pueden formular en composiciones inmunogénicas, por ejemplo, de vacuna, y se pueden formular opcionalmente con las vacunas basadas en HPV L1 VLP.

Sector: preparaciones medicinales que contienen antígenos o anticuerpos, particularmente antígenos virales. Péptidos que contienen más de 20 aminoácidos a partir de virus de ADN, particularmente de la familia papovaviridae, específicamente papilomavirus.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) No. de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 04-01-12

(51) Clasificación Internacional: A61K 39/12

(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es): BAUDOX, Guy Jean Marie Fernand Pierre; COLAU, Brigitte Desiree Alberte; DENDOUGA, Najoua; GIANNINI, Sandra y LECRENIER, Nicolas Pierre, Fernand.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/220,358	25-06-09	US
	61/239,880	04-09-09	US
	61/322,102	08-04-10	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 25-01-12

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 24-06-10
No. de solicitud: PCT/EP2010/059024

(87) Publicación internacional:

Fecha: 29-12-10

No. Publicación: WO 2010/149752 A3

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: "CONSTRUCCIONES NOVEDOSAS DE PROTEÍNA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV) Y SU USO EN LA PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD POR EL HPV"

(57) Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.- La divulgación proporciona construcciones novedosas de proteína del virus de papiloma humano (HPV) y su uso en la prevención de la enfermedad por el HPV. Las construcciones son proteínas quiméricas que comprenden proteínas L1 con un péptido L2 de HPV insertado en la proteína L1. Estas proteínas quiméricas se pueden formular en composiciones inmunogénicas, por ejemplo, de vacuna, y se pueden formular opcionalmente con las vacunas basadas en HPV L1 VLP.

Sector: preparaciones medicinales que contienen antígenos o anticuerpos, particularmente antígenos virales. Péptidos que contienen más de 20 aminoácidos a partir de virus de ADN, particularmente de la familia papovaviridae, específicamente papilomavirus.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____																				
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 04-01-12																					
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/12																					
(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.																					
(72) Inventor(es): BAUDOX, Guy Jean Marie Fernand Pierre; COLAU, Brigitte Desiree Alberte; DENDOUGA, Najoua; GIANNINI, Sandra y LECRENIER, Nicolas Pierre, Fernand.																					
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE																					
<table><tr><td>(30) Prioridad</td><td>(31)</td><td>No. Prioridad</td><td>(32) Fecha</td><td>(33) País</td></tr><tr><td></td><td></td><td>61/220,358</td><td>25-06-09</td><td>US</td></tr><tr><td></td><td></td><td>61/239,880</td><td>04-09-09</td><td>US</td></tr><tr><td></td><td></td><td>61/322,102</td><td>08-04-10</td><td>US</td></tr></table>		(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País			61/220,358	25-06-09	US			61/239,880	04-09-09	US			61/322,102	08-04-10	US
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País																	
		61/220,358	25-06-09	US																	
		61/239,880	04-09-09	US																	
		61/322,102	08-04-10	US																	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 25-01-12																					
(87) Publicación internacional																					
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT																					
Fecha: 29-12-10																					
Fecha de presentación de la solicitud: 24-06-10																					
No. publicación: WO 2010/149752 A3																					
No. de solicitud: PCT/EP2010/059024																					
(54) Título: "CONSTRUCCIONES NOVEDOSAS DE PROTEÍNA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV) Y SU USO EN LA PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD POR EL HPV"																					



- (51) International Patent Classification:
A61K 39/12 (2006.01) C07K 14/025 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2010/059024
- (22) International Filing Date:
24 June 2010 (24.06.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/220,358 25 June 2009 (25.06.2009) US
61/239,880 4 September 2009 (04.09.2009) US
61/322,102 8 April 2010 (08.04.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **BAUDOUX, Guy Jean Marie Fernand Pierre** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart

(BE). COLAU, Brigitte Desirée Alberte [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **DENDOUGA, Najoua** [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **GIANNINI, Sandra** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **LECRENIER, Nicolas Pierre Fernand** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Parc de la Noire Epine, rue Fleming 20, B-1300 Wavre (BE).

(74) Agents: **DALTON, Marcus Jonathan William et al.**; GlaxoSmithKline, Global Patents CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,

[Continued on next page]

(54) Title: **NOVEL HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) PROTEIN CONSTRUCTS AND THEIR USE IN THE PREVENTION OF HPV DISEASE**

Figure 1A

HPV16 and -18 L1 Loop DE



Figure 1B

HPV16 and -18 L1 Loop FC

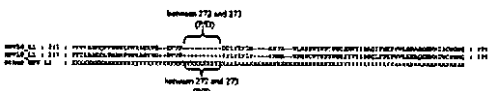


Figure 1C

HPV16 and -18 L1 Loop HI

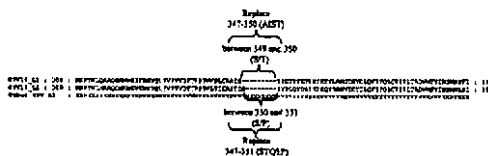
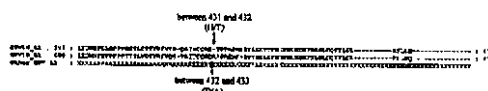


Figure 1D

HPV16 and -18 L1 C-term



(57) Abstract: The disclosure provides novel human papillomavirus (HPV) protein constructs and their use in the prevention of HPV disease. The constructs are chimeric proteins comprising L1 proteins with an HPV L2 peptide inserted in to the L1 protein. Such chimeric proteins may be formulated into immunogenic e.g. vaccine compositions, and optionally formulated with HPV L1 VLP based vaccines.

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(88) **Date of publication of the international search report:**
31 March 2011

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DALTON, Marcus Jonathan William
GlaxoSmithKline
Global Patents CN925.1
980 Great West Road
Brentford
Middlesex TW8 9GS
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 15 December 2011 (15.12.2011)	
Applicant's or agent's file reference MJD/VB63752	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2010/059024	International filing date (day/month/year) 24 June 2010 (24.06.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address GLAXOSMITHLINE BIOLOGICALS S.A. rue de l'Institut 89 B-1330 Rixensart Belgium	State of Nationality BE	State of Residence BE
	Telephone No. +44 20 8047 5000	
	Facsimile No. +44 20 8047 6894	
	E-mail address cipukadmin@gsk.com	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. rue de l'Institut 89 B-1330 Rixensart Belgium	State of Nationality BE	State of Residence BE
	Telephone No. +44 20 8047 5000	
	Facsimile No. +44 20 8047 6894	
	E-mail address cipukadmin@gsk.com	
	☒ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office ☐ the International Preliminary Examining Authority		
☐ the International Searching Authority ☒ the designated Offices concerned		
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search ☐ the elected Offices concerned		
☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Monnier Sandrine
Facsimile No. +41 22 338 89 75	e-mail pt05.pct@wipo.int
Form PCT/IB/306 (January 2009)	Telephone No. +41 22 338 74 05

1/PTP3NPMN9XPH90

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MJD/VB63752	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/059024	International filing date (day/month/year) 24/06/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 25/06/2009
Applicant GLAXOSMITHLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☐

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒

With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒

Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

☐

the text is approved as submitted by the applicant

☒

the text has been established by this Authority to read as follows:

NOVEL HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) PROTEIN CONSTRUCTS AND THEIR USE IN THE PREVENTION OF HPV DISEASE

5. With regard to the abstract,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 2

☐

as suggested by the applicant

☒

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/059024

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-37(completely); 38, 42-88(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/12 C07K14/025

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	EP 2 168 977 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]) 31 March 2010 (2010-03-31) abstract paragraph [0015] - paragraph [0030] paragraph [0051] claims 1-21	1-38, 42-88
Y	& WO 2009/001867 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]; KANDA TADAHITO [JP]; KONDO KAZUNARI []) 31 December 2008 (2008-12-31) -----	1-38, 42-88
Y	WO 2007/018049 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]; KANDA TADAHITO [JP]; KONDO KAZUNARI []) 15 February 2007 (2007-02-15) abstract ----- -/--	1-38, 42-88



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 2010

Date of mailing of the international search report

03/02/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mossier, Birgit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/097673 A2 (UNIV CAPE TOWN [ZA]; VARSANI ARVIND DEVSHI [ZA]; RYBICKI EDWARD PETER) 27 November 2003 (2003-11-27) abstract page 7 - page 10 -----	1-38, 42-88
Y	KONDO ET AL: "Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US LNKD- DOI:10.1016/J.VIROL.2006.08.037, vol. 358, no. 2, 25 January 2007 (2007-01-25), pages 266-272, XP005853978 ISSN: 0042-6822 abstract figure 2 -----	1-38, 42-88
X	WO 2009/059325 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; RODEN RICHARD B S [US] UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 7 May 2009 (2009-05-07) abstract paragraph [0008] - paragraph [0011] SEQ ID NOs:75,87,98, -----	38
Y	BISHOP B ET AL: "Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: Understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 20071026 AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INC. US, vol. 282, no. 43, 26 October 2007 (2007-10-26), pages 31803-31811, XP002608877 DOI: DOI:10.1074/JBC.M706380200 abstract; figure 1 -----	1-38, 42-88
Y	KAZUNARI KONDO ET AL: "Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes" JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, JOHN WILEY & SONS, INC, US LNKD- DOI:10.1002/JMV.21124, vol. 80, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 841-846, XP008126685 ISSN: 0146-6615 abstract; figure 1 ----- -/--	1-38, 42-88

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/077942 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; WETTENDORFF MARTINE ANNE CECIL [BE]) 25 September 2003 (2003-09-25) abstract page 2, paragraph 4 - page 5 example 1 -----	1-38, 42-88
Y	EP 1 422 294 A1 (MERCK & CO INC [US]) 26 May 2004 (2004-05-26) abstract paragraph [0010] - paragraph [0022]; examples 13-15 -----	1-38, 42-88
A	GIROGLOU T ET AL: "Immunological analyses of human papillomavirus capsids" VACCINE, ELSEVIER LTD, GB LNKD- DOI:10.1016/S0264-410X(00)00370-4, vol. 19, no. 13-14, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1783-1793, XP002248440 ISSN: 0264-410X abstract -----	1-38, 42-88
A	LIAO SHUJIE ET AL: "Production and verification of human papillomavirus type 18 vaccine in vitro." ONCOLOGY REPORTS JUL 2008 LNKD- PUBMED:18575739, vol. 20, no. 1, July 2008 (2008-07), pages 211-217, XP002608878 ISSN: 1021-335X abstract -----	1-38, 42-88

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/059024

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2168977	A1	31-03-2010	AU 2008268014 A1	31-12-2008
			CA 2691745 A1	31-12-2008
			CN 101835796 A	15-09-2010
			WO 2009001867 A1	31-12-2008
			KR 20100029216 A	16-03-2010
			US 2010183648 A1	22-07-2010

WO 2009001867	A1	31-12-2008	AU 2008268014 A1	31-12-2008
			CA 2691745 A1	31-12-2008
			CN 101835796 A	15-09-2010
			EP 2168977 A1	31-03-2010
			KR 20100029216 A	16-03-2010
			US 2010183648 A1	22-07-2010

WO 2007018049	A1	15-02-2007	JP 2007045746 A	22-02-2007

WO 03097673	A2	27-11-2003	AT 424409 T	15-03-2009
			AU 2003232951 A1	02-12-2003
			CA 2486450 A1	27-11-2003
			DK 1506222 T3	06-07-2009
			EP 1506222 A2	16-02-2005
			ES 2323634 T3	23-07-2009
			JP 2006507797 T	09-03-2006
			JP 2010263899 A	25-11-2010
			PT 1506222 E	12-06-2009
			SI 1506222 T1	31-10-2009
			US 2009047302 A1	19-02-2009
			US 2006035319 A1	16-02-2006

WO 2009059325	A2	07-05-2009	AU 2008318320 A1	07-05-2009
			CA 2704455 A1	07-05-2009
			CN 101896194 A	24-11-2010
			EP 2211899 A2	04-08-2010
			KR 20100098617 A	08-09-2010
			US 2010297144 A1	25-11-2010

WO 03077942	A2	25-09-2003	AP 1872 A	31-08-2008
			AR 039005 A1	02-02-2005
			AU 2003218787 A1	29-09-2003
			BR 0308444 A	18-01-2005
			CA 2479304 A1	25-09-2003
			CN 1642571 A	20-07-2005
			EC SP045300 A	03-01-2005
			EP 1492562 A2	05-01-2005
			EP 2044953 A1	08-04-2009
			IL 163814 A	20-07-2009
			IS 7426 A	15-09-2004
			JP 2005524674 T	18-08-2005
			JP 2010090158 A	22-04-2010
			MX PA04009060 A	25-01-2005
			NZ 535085 A	31-08-2006
			OA 12787 A	10-07-2006
			US 2008279890 A1	13-11-2008
			US 2005175632 A1	11-08-2005
			US 2007224218 A1	27-09-2007
			ZA 200407029 A	02-09-2005

EP 1422294	A1	26-05-2004	NONE	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-37(completely); 38, 42-88(partially)

A human papilloma virus (HPV) type 18 L1 polypeptide comprising at least one peptide comprising an epitope of an L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto.

2. claims: 38, 42-88(all partially)

A polypeptide comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:32, 33, 34 or 35 and the subject-matter relating thereto.

3. claims: 39-41(completely); 42-88(partially)

A human papilloma virus (HPV) type 16 L1 polypeptide comprising a peptide comprising amino acids 56 - 75 of an HPV L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto.

4. claims: 66-74, 85-88(all partially)

A composition comprising a VLP comprising a HPV L1 polypeptide and at least one chimeric polypeptide comprising HPV L1 comprising an L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto as far as not covered by Inventions 1 and 3.

5. claims: 75-88(partially)

A composition comprising a combination of two or more chimeric polypeptides comprising a HPV L1 polypeptide comprising an epitope of an L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto as far as not covered by Inventions 1 and 3.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2010/059024

International filing date (day/month/year)
24.06.2010

Priority date (day/month/year)
25.06.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/12 C07K14/025

Applicant
GLAXOSMITHLINE BIOLOGICALS S.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Mossier, Birgit

Telephone No. +49 89 2399-8706



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2010/059024

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 39-41(completely); 38, 42-88(partially)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 39-41(completely); 38, 42-88(partially)
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-37(completely); 38, 42-88(partially)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-37(completely); 38, 42-88(partially)</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-37(completely); 38, 42-88(partially)</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-37(completely); 38, 42-88(partially)</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2010/059024

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Present application discloses an improved vaccine against human papilloma virus which contains antigens which provides protection against additional cancer causing HPV types and/or low risk HPV types associated with genital warts. The improved vaccines contain chimeric L1 polypeptides into which at least one peptide comprising an epitope of an L2 polypeptide is inserted. Specific chimeric constructs as set forth in SEQ ID NO:36 - 45 as well as their effects with regard to immunogenicity and/or neutralization are described. Different HPV genotypes as "L1 backbone" (type 16 and 18) as well as L2 epitopes derived from different HPV genotypes (SEQ ID NO:1 - 35) are referred to; moreover, some claims do not refer to any HPV genotype at all.

Re Item IV

Lack of unity of invention

This Authority considers that the application does not meet the requirements of unity of invention and that there are 5 inventions covered by the claims indicated as follows:

- Invention 1 (claims 1 - 37 (complete); claims 38, 42-88 (partially))

A human papilloma virus (HPV) type 18 L1 polypeptide comprising at least one peptide comprising an epitope of an L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto.

- Invention 2 (claims 38, 42-88 (partially))

A polypeptide comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:32, 33, 34 or 35 and the subject-matter relating thereto.

- Invention 3 (claims 39 - 41 (complete); claims 42-88 (partially))

A human papilloma virus (HPV) type 16 L1 polypeptide comprising a peptide comprising amino acids 56 - 75 of an HPV L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto.

- Invention 4 (claims 66-74, 85-88 (partially))

A composition comprising a VLP comprising a HPV L1 polypeptide and at least one chimeric polypeptide comprising HPV L1 comprising an L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto as far as not covered by Inventions 1 and 3.

- Invention 5 (claims 75-88 (partially))

A composition comprising a combination of two or more chimeric polypeptides comprising a HPV L1 polypeptide comprising an epitope of an L2 polypeptide inserted within the HPV L1 polypeptide and the subject-matter relating thereto as far as not covered by Inventions 1 and 3.

According to Article 3(4)(iii) and Rule 13 PCT an application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Where a group of inventions is claimed, the requirement of unity is fulfilled only when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same corresponding special technical features (Rule 13.2 PCT). Special technical features are those features that define a contribution which each of the inventions makes over the prior art.

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows:

Present application relates to human HPV protein constructs and their use in the prevention of HPV disease. The constructs are chimeric proteins comprising L1 proteins with an HPV L2 peptide inserted into the L1 protein.

Said protein constructs generally relate to HPV L1 proteins and/or L2 without indicating a specific genotype (Inventions 4 and 5), or they are characterised by an HPV type 18 L1 protein or HPV type 16 L1 protein (Inventions 1 and 3). Moreover, some protein construct are merely defined by the presence of a particular L2 epitope (Invention 2).

Protein constructs which comprise an L2 epitope inserted in a L1 protein as well as L2 epitopes per se as well as their use in the prevention of HPV disease are known from the prior art, see e.g. WO2009/001867 and WO2003/097673 which disclose chimeric proteins comprising an L2 epitope of HPV type 16 inserted in the HPV type 16 L1 protein (see Abstracts). In addition, WO2009/059325 relates multitype HPV L2 peptide compositions (see Abstract and in particular SEQ ID NOs: 75, 87, 98 that comprise SEQ ID NOs:33- 35 of the present application).

In view of the prior art the problem underlying the present application can be regarded as the provision of further protein constructs that can be use in the prevention of HPV. The claimed inventions solve this problem by providing 5 different groups of protein constructs wherein each of said groups comprises a different HPV L1 genotype and/or a specific L2 peptide (see Inventions 1 - 5).

At best, the only feature common to the five inventions of protein constructs is that an L2 epitope is inserted in the L1 protein (Remark: Invention 2 merely refers to any protein construct comprising an L2 epitope as set forth in e.g. SEQ ID NO:32 - 35). However, this feature cannot represent a special technical feature in the sense of Rule 13.2 PCT since it has already been known from the prior art.

In view of the fact that protein constructs which comprise an L2 epitope inserted in a L1 protein as well as L2 epitopes per se as well as their use in the prevention of HPV disease have been disclosed and in view of the fact that no other technical feature can

be distinguished which, in the light of the prior art, could serve as special technical feature in the sense of Rule 13.2 PCT that would provide a link between the plurality of solutions provided, the Search Division is of the opinion that there is no single inventive concept underlying the inventions 1 - 5.

Consequently, the five groups of claims are not linked by a single general inventive concept as required by Rule 13.1 PCT. The application does therefore not meet the requirements of unity.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Documents

Reference is made to the following documents:

- D1 EP 2 168 977 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]) 31 March 2010 (2010-03-31) ; & WO 2009/001867 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]; KANDA TADAHITO [JP]; KONDO KAZUNARI [J]) 31 December 2008 (2008-12-31)
- D2 WO 2007/018049 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]; KANDA TADAHITO [JP]; KONDO KAZUNARI [J]) 15 February 2007 (2007-02-15)
- D3 WO 03/097673 A2 (UNIV CAPE TOWN [ZA]; VARSANI ARVIND DEVSHI [ZA]; RYBICKI EDWARD PETER) 27 November 2003 (2003-11-27)
- D4 BISHOP B ET AL: "Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: Understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 20071026 AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INC. US, vol. 282, no. 43, 26 October 2007 (2007-10-26) , pages 31803-31811, DOI: DOI:10.1074/JBC.M706380200
- D5 WO 03/077942 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; WETTENDORFF MARTINE ANNE CECIL [BE]) 25 September 2003 (2003-09-25)
- D6 EP 1 422 294 A1 (MERCK & CO INC [US]) 26 May 2004 (2004-05-26)

- 1.1 D1 corresponds to WO 2009/001867 which has been published on 31.12.2008 and it is considered as prior art. Since WO 2009/001867 is in Japanese, reference is given to D1, an EP application which has been published on 31.03.2010.

2 Patentability

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment. Patentability, in particular novelty and inventive step, of claim 86 and 87 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition.

3 Novelty (Article 33(2) PCT)

The subject-matter referred to in claims 1 - 38 and 42 - 88 appears to fulfill the requirements of Article 33(2) PCT since the available prior art does not disclose a human HPV type 18 L1 polypeptide comprising at least one peptide comprising an epitope of an L2 polypeptide inserted within the L1 polypeptide.

4 Inventive Step (Article 33(3) PCT)

Several prior art documents disclose chimeric proteins comprising an L2-epitope of a human papillomavirus (HPV) type 16 inserted within a HPV type 16 L1 protein and their use in the prevention of HPV infection and/or disease (see D1: Abstract, D2: Abstract; D3: Abstract, page 7 - page 10).

Each of these documents can be equally considered as closest prior art.

The present application differs from e.g. D3 in that the L2 epitope is inserted within a HPV type 18 L1 protein.

The problem underlying the present application can be regarded as the provision of a further chimeric HPV polypeptide that can be used in the treatment/prevention of HPV disease.

The solution provided by the present application is HPV type 18 L1 polypeptide comprising an L2 epitope inserted with the HPV type 18 L1 polypeptide.

HPV vaccines comprising HPV type 18 L1 as well as HPV type 16 L1 polypeptides are well known in the prior art (see e.g. D5, D6). D4 discloses an alignment of the L1 capsid proteins of the HPV types 16, 35, 11 and 18 wherein the five loops displayed on the surface of the virus particles are

indicated. It would be obvious and without the exercise of inventive skill to combine the teaching of D3 with the disclosure of D4. Hence, it appears that claim 1 does not fulfill the requirements of Article 33(3) PCT.

The dependent claims 2 - 38 and 42 - 88 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

The term "fragment" used in claim 1 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear (Article 6 PCT). A "fragment" of a protein can be e.g. as small as two or three amino acid molecules.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

**CONSTRUCCIONES NOVEDOSAS DE PROTEÍNA DEL VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO (HPV) Y SU USO EN LA PREVENCIÓN DE LA
ENFERMEDAD POR EL HPV**

5 RESUMEN- OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La divulgación proporciona construcciones novedosas de proteína del virus de papiloma humano (HPV) y su uso en la prevención de la enfermedad por el HPV. Las construcciones son

10 proteínas quiméricas que comprenden proteínas L1 con un péptido L2 de HPV insertado en la proteína L1. Estas proteínas quiméricas se pueden formular en composiciones inmunogénicas, por ejemplo, de vacuna, y se pueden formular opcionalmente con las vacunas basadas en HPV L1 VLP.

15

Sector: preparaciones medicinales que contienen antígenos o anticuerpos, particularmente antígenos virales. Péptidos que contienen más de 20 aminoácidos a partir de virus de ADN, particularmente de la familia papovaviridae, específicamente

20 papilomavirus.

25

**CONSTRUCCIONES NOVEDOSAS DE PROTEÍNA DEL VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO (HPV) Y SU USO EN LA PREVENCIÓN DE LA
ENFERMEDAD POR EL HPV**

5

ANTECEDENTES

La presente divulgación se relaciona con el campo de las vacunas humanas. Más particularmente, la presente divulgación se relaciona con composiciones farmacéuticas e inmunogénicas, para la prevención o el tratamiento de la infección o la enfermedad por virus de papiloma humano (HPV).

Los virus de papiloma son virus de ADN de tumores pequeños, muy específicos para cada especie. Los virus de papiloma humano son virus de ADN que infectan las células epiteliales basales (piel o mucosas). Se han descrito más de 100 genotipos de virus de papiloma humano individuales (HPV). Los virus de papiloma humano generalmente son específicos ya sea para el epitelio escamoso de la piel (por ejemplo HPV-1 y -2) o las superficies de las mucosas (por ejemplo HPV-6 y -11) y usualmente causan tumores benignos (verrugas) que persisten durante varios meses o años.

La infección persistente con el tipo de virus de papiloma humano (HPV) oncogénico es una causa necesaria del cáncer cervical, la segunda causa más común de la muerte por cáncer entre las mujeres en todo el mundo. Hay un consenso internacional de que los genotipos "de alto riesgo", incluyen los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66, pueden conducir al cáncer

cervical y se asocian otros cánceres en la mucosa ano-genital y en la cabeza y cuello. Globalmente, los HPV-16 y HPV-18 son los tipos oncogénicos predominantes, que acumulativamente suman más del 70-80 por ciento de todos los casos de cáncer cervical invasivo.

5 Las infecciones con otros genotipos, denominados de "bajo riesgo", pueden causar verrugas genitales y cambios en el tejido cervical benigno o de grado bajo (condiloma acuminata), los cuales son crecimientos sobre el cérvix, la vagina, vulva y el ano en mujeres y en el pene, escroto o ano en los hombres. También causan
10 crecimientos epiteliales sobre las cuerdas vocales de niños y adultos (papilomatosis respiratoria juvenil o papilomatosis respiratoria recurrente) que requieren intervención quirúrgica.

Recientemente se han autorizado dos vacunas profilácticas de HPV. Ambas usan partículas parecidas al virus (VLP) compuestas de
15 proteínas cápsidas L1 recombinantes de tipos de virus de papiloma humano para prevenir los cánceres y las lesiones precancerosas cervicales HPV-16 y -18. *Cervarix^{MR}* (GlaxoSmithKline Biologicals) contiene VLPs de HPV-16 y -18 producidas en un sustrato de células de *Trichoplusia ni* que usan un sistema de vector de expresión de
20 baculovirus y que están formuladas con el lípido inmunoestimulante 3-O-desacil-4'-monofosforilo lípido A (MPL) y sal de hidróxido de aluminio.

Gardasil^{MR} (Merck) contiene HPV-16 y -18 VLPs producidas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y formulada con sal de sulfato
25 hidrofosfato de aluminio amorfo. Además, *Gardasil^{MR}*, contiene

partículas parecidas a virus de tipos no oncogénicos HPV-6 y -11, que están implicados en el 75 al 90 por ciento de las verrugas genitales. Para ambas vacunas, se ha demostrado la protección específica contra la infección con los tipos oncogénicos HPV-16 y HPV-18 y asociados con lesiones precancerosas en ensayos clínicos aleatorios.

La lista de los tipos de virus de papiloma humano oncogénicos que son responsables de causar el cáncer cervical incluye cuando menos los tipos de virus de papiloma humano 16, 18, 31, 33, 35 ,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 73 encontrados en el cáncer cervical (Mahdavi y colaboradores, 2005; Quint y colaboradores, 2006).

Las vacunas existentes son capaces de proporcionar protección específica contra la infección y/o la enfermedad por algunos de estos tipos de virus de papiloma humano y a diversos grados. Sin embargo sería potencialmente benéfico tener una vacuna que ya sea que contuviera antígenos de otros tipos de virus de papiloma humano con el fin de mejorar adicionalmente la cobertura contra todos los tipos de virus de papiloma humano que causan cáncer cervical o pudieran provocar una protección cruzada amplia contra los tipos de virus de papiloma humano relacionados y los no relacionados. Sería potencialmente benéfico tener una vacuna que fuera más efectiva contra los tipos de virus de papiloma humano que causan el cáncer de piel tales como el HPV 5 o HPV 8 o el HPV 38 o cualquier combinación de dos o más de estos.

Además de las vacunas de partículas parecidas a virus de L1

aprobada, se han propuesto péptidos de L2 para su uso en una
 vacuna para el virus de papiloma humano por ejemplo en WO
 2003/097673, WO 2004/052395, WO 2006/083984, WO 2009/001867,
 Kondo y colaboradores 2008 J Med Virol 80, 841-846, Kondo y
 5 colaboradores 2006 Virology 358, 266-272, Schellenbacher y
 colaboradores 2009 25th International Papillomavirus Conference 8-14
 de Mayo, Malmo, Suecia, Coursaget y colaboradores, 25th
 International Papillomavirus Conference 8-14th May, Malmo, Suecia,
 Slupetzky y colaboradores 2007 J Virol 81, 13927-13931, Alphs y
 10 colaboradores 2008 PNAS 105, 5850-5, Kawana y colaboradores
 2003 Vaccine 21, 4256-60, Kawana y colaboradores 2001 Vaccine
 19, 1496-1502.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente divulgación se relaciona con una vacuna mejorada
 15 contra el virus de papiloma humano el cual contiene antígenos que
 proporcionan protección contra los tipos de virus de papiloma
 humano que causan cáncer adicional y/o los tipos de virus de
 papiloma humano de bajo riesgo asociados con las verrugas
 genitales. Las vacunas mejoradas contienen polipéptidos L1
 20 quiméricos en los cuales se inserta cuando menos un péptido que
 comprende un epítipo de un polipéptido L2.

En una modalidad de la invención se proporciona un
 polipéptido L1 tipo 18 de virus de papiloma humano (HPV) o
 fragmento del mismo que comprende cuando menos un péptido que
 25 comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del

polipéptido HPV L1. En una modalidad el polipéptido comprende cuando menos dos péptidos de un polipéptido L2.

En una modalidad alternativa la invención proporciona un polipéptido L1 tipo 16 de virus de papiloma humano (HPV) o
5 fragmento del mismo que comprende un péptido que comprende los aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1.

Los polipéptidos quiméricos de la invención se pueden presentar como capsómeros o partículas parecidas a virus (VLP).
10 Estos polipéptidos, capsómeros y partículas parecidas a virus se pueden formular en composiciones inmunogénicas. Los métodos para su fabricación, seguridad y para su uso por ejemplo en la formulación de medicinas para la prevención de infecciones por virus de papiloma humano se describen enseguida.

15 La invención además proporciona una composición que comprende:

(i) una partícula parecida a virus (VLP) de virus de papiloma humano (HPV) L1; y

(ii) al menos un polipéptido quimérico HPV L1, capsómero o
20 partículas parecidas a virus, que comprende un péptido L2 en la secuencia de L1.

La invención además proporciona una composición que comprende una combinación de dos o más polipéptido quimérico de HPV L1, capsómeros o VLP, comprendiendo cada L1 un péptido L2
25 en la secuencia de L1.

La invención además proporciona una composición que comprende:

(i) al menos una partícula parecida a virus (VLP) L1 de virus de papiloma humano (HPV); y

5 (ii) al menos un polipéptido, capsómero o VLP L1 de virus de papiloma humano quimérico que comprende un péptido L2 en la secuencia de L1, para su uso en la prevención o tratamiento de un trastorno relacionado con infección por virus de papiloma humano.

La invención además proporciona una composición que
10 comprende una combinación de dos o más polipéptidos, capsómeros o partículas parecidas a virus L1 del virus de papiloma humano (HPV) que comprende un péptido L2 en la secuencia de L1, para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno relacionado con una infección por virus de papiloma humano.

15 La invención además proporciona el uso de:

(i) al menos una partícula parecida a virus (HPV) L1 de virus de papiloma humano (HPV); y

(ii) al menos un polipéptido, capsómero o partícula parecida a virus L1 de virus de papiloma humano quimérico que comprende un
20 péptido L2 en la secuencia de L1 en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno relacionado con la infección por virus de papiloma humano.

La invención además proporciona el uso de una combinación de dos o más polipéptidos, capsómeros o partículas parecidas a
25 virus L1 de virus de papiloma humano quimérico que comprende un

péptido L2 en la secuencia de L1, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno relacionado con la infección por virus de papiloma humano.

La invención además proporciona un polipéptido, capsómero o
5 partícula parecida a virus L1 HPV quimérico que comprende dos o más péptidos L2 en la secuencia de L1.

En otro aspecto la invención proporciona un método para inducir anticuerpos contra el virus de papiloma humano en humanos que comprende administrar a un humano una composición
10 inmunogénica de acuerdo con la invención descrita en la presente.

En otro aspecto la invención proporciona un método para inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus de papiloma humano en humano que comprende administrar a un humano una composición inmunogénica de acuerdo con la invención descrita en
15 la presente. Este método puede inducir anticuerpos de neutralización cruzada.

En otro aspecto la invención proporciona un método para inducir inmunidad celular contra el virus de papiloma humano en los humanos que comprende administrar a un humano una composición
20 inmunogénica de acuerdo con la invención descrita en la presente.

En otro aspecto la invención proporciona un método para inducir anticuerpos neutralizantes y con inmunidad celular contra los virus de papiloma humano en los humanos que comprende administrar a un humano una composición inmunogénica de acuerdo
25 con la invención descrita en la presente. Este método también puede

inducir anticuerpos de neutralización cruzada.

La invención además proporciona un método para prevenir la infección por virus de papiloma humano o la enfermedad por virus de papiloma humano relacionado con la infección de virus de papiloma humano, este método comprende administrar a un humano una
5 composición inmunogénica de acuerdo con la invención.

La invención además proporciona un método para preparar una composición inmunogénica donde este método comprende combinar (i) cuando menos una partícula parecida a virus (VLP) L1 de virus de papiloma humano (HPV), con (ii) cuando menos un polipéptido, capsómero o partículas parecidas a virus L1 de virus de papiloma humano quimérico que comprende un péptido L2 en la secuencia de L1, y (iii) un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y
10 opcionalmente (iv) un adyuvante, para producir una composición inmunogénica como se describe en la presente. La invención además proporciona métodos para la purificación de los polipéptidos quiméricos como se describe en la presente, este método que comprende cromatografía por intercambio de aniones y cromatografía de hidroxapatita.
15

La invención además proporciona un método para preparar una composición inmunogénica donde este método comprende combinar dos o más polipéptidos, capsómeros o partículas parecidas a virus L1 de virus de papiloma humano quimérico que comprende un péptido L2 en la secuencia de L1.
20

La invención además proporciona un método para preparar una
25

composición que comprende combinar un polipéptido HPV L1 la cual comprende un epítipo de péptidos de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido L1 y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una secuencia de L1 truncada en el extremo C para HPV 16 y HPV 18. La numeración de aminoácidos para las secuencias de HPV 16 y HPV 18 de la Figura 1 (a) y (b) respectivamente se usa en toda la especificación en relación con el L1 de HPV 16 y HPV 18.

10

La Figura 2 muestra los casos expuestos de HPV 16 y HPV 18 L1 y los lugares de ejemplo para la inserción de los péptidos L2 en la secuencia de L1.

La Figura 3 muestra alineaciones para las secuencias L1 para HPV 16, 18 y otros tipos, en las regiones de lazo expuesto y en la región del brazo invasor del extremo C. La secuencia en la parte superior es la secuencia HPV 16 L1 mostrada en la Figura 1.

15

La Figura 4 muestra péptidos L2 de varios tipos diferentes de virus de papiloma humano (HPV).

20

La Figura 5 muestra un diagrama de flujo para la purificación de polipéptidos quiméricos L1/L2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

INTRODUCCIÓN

Esta divulgación se refiere a las composiciones y los métodos para la prevención y el tratamiento de la enfermedad causada por la

25

infección con virus de papiloma humano (HPV). Más específicamente, esta divulgación se relaciona con los polipéptidos quiméricos que contienen componentes inmunogénicos de la proteína cápsida mayor, L1 y de la proteína cápsida menor, designada L2. Los polipéptidos quiméricos descritos en la presente incluyen un polipéptido L1 en el cual cuando menos se ha insertado un péptido L2. El péptido L2 se selecciona para incluir cuando menos un epítipo de un polipéptido L2.

En una modalidad, el polipéptido L1 es un polipéptido L1 de HPV tipo 18. De este modo, el polipéptido quimérico L1/L2 incluye el polipéptido L1 de HPV tipo 18 o un fragmento del mismo en el cual se inserta cuando menos un péptido que incluye un epítipo de un polipéptido L2. Por ejemplo, el péptido L2 puede ser de un tipo de virus de papiloma humano distinto del tipo 18 (esto es, un péptido L2 no de HPV tipo 18). De manera favorable, el polipéptido L1/L2 es capaz de inducir una respuesta inmunitaria a una proteína natural que comprende el polipéptido L2 del cual se selecciona el péptido. Adicionalmente, el polipéptido L1/L2 puede ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria a cuando menos una proteína L2 natural adicional.

En una modalidad, el o los péptidos L2 se seleccionan de los aminoácidos 1 a 200 del extremo N de un polipéptido HPV L2, tal como los aminoácidos 1-150 del extremo N de un polipéptido HPV L2. En modalidades específicas, los péptidos L2 se seleccionan del grupo seleccionado de: un péptido que comprende los residuos de

aminoácidos 17-36 de un polipéptido HPV L2; un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2; un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 96-115 de un polipéptido HPV L2; y un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 108-120 de un polipéptido HPV L2. En varias modalidades, el péptido o los péptidos L2, incluyen una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NOs: 1-31. En una modalidad ejemplar, el péptido L2 consiste en los aminoácidos 17-36 de HPV tipo 33 L2 (que es idéntica al aminoácido 17-36 de HPV tipo 11 L2).

En otra modalidad ejemplar, el péptido L2 consiste en los aminoácidos 56-75 de HPV tipo 58 L2 (que es idéntico a los aminoácidos 56-75 del HPV tipo 6 L2). Más generalmente, un péptido L2 se puede seleccionar para incluir cuando menos 8 aminos contiguos que sean idénticos a los polipéptidos L2 de cuando menos dos tipos diferentes de virus de papiloma humano (esta es una secuencia de consenso entre dos o más tipos de HPV).

En otra modalidad, el polipéptido quimérico L1/L2 incluye un polipéptido HPV L1 tipo 16 o fragmento del mismo en el cual se ha insertado un péptido que comprende los aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2. Por ejemplo, el péptido L2 debe incluir los aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2 de un tipo oncogénico de virus de papiloma humano, tal como el HPV tipo 58.

En ciertas modalidades, el péptido L2 que se inserta en el polipéptido L1 para formar un polipéptido quimérico L1/L2 incluye cuando menos una inserción, supresión o sustitución de aminoácidos

en comparación con un polipéptido L2 natural. En una modalidad, el péptido L2 tiene cuando menos una inserción, supresión o sustitución de aminoácidos que remueve un enlace disulfuro entre dos cisteínas o remueve los aminoácidos entre dos cisteínas capaces de formar un enlace disulfuro. De manera favorable; un polipéptido que incluye un polipéptido que incluye un péptido L2 con una inserción de aminoácidos, supresión o sustitución es capaz de inducir una respuesta inmunitaria a cuando menos una proteína L2 natural (o un polipéptido L2 que se presenta naturalmente).

En una modalidad, la proteína HPV L1 tiene una supresión en el extremo C de uno o más aminoácidos. En ciertas modalidades, el o los péptidos L2 se insertan en una región expuesta del polipéptido L1. En varias modalidades, el lazo expuesto puede ser el lazo DE (por ejemplo entre los aminoácidos 132-142); el lazo FG (por ejemplo entre los aminoácidos 172-182); el lazo HI (por ejemplo entre los aminoácidos 345-359); y/o el extremo C del polipéptido L1 (por ejemplo entre los aminoácidos 429 y 445). En una modalidad, se insertan dos o más péptidos L2 dentro del polipéptido L1. Por ejemplo, los dos o más péptidos L2 se pueden insertar en el mismo sitio por ejemplo, como una serie contigua de aminoácidos o concatámeros), o en diferentes sitios, tales como dentro del lazo DE y en el extremo C del polipéptido L1. Opcionalmente, cuando se insertan en el mismo sitio, los dos o más péptidos L2 pueden estar unidos por cuando menos un aminoácido adicional, tal como un espaciador que comprende una pluralidad de aminoácidos. Cuando

se insertan dos o más péptidos L2 en el polipéptido L1, los péptidos L2 pueden ser iguales o diferentes. Típicamente, el péptido o péptidos L2 incluyen cuando menos 8 aminoácidos contiguos de un polipéptido L2 natural.

- 5 En ciertas modalidades, los péptidos L2 se insertan dentro del polipéptido L1 sin suprimir un aminoácido del polipéptido L1. En otras modalidades, el o los péptidos L2 se insertan en el polipéptido L1 con la supresión de uno o más aminoácidos del polipéptido L1.

- 10 En algunas modalidades, el L1/L2 quimérico es un ensamble supramolecular de polipéptidos quiméricos, por ejemplo en partículas de polipéptido, tales como agregados amorfos, o estructuras más ordenadas, por ejemplo, un capsómero o una partícula parecida a virus (VLP) o estructuras pequeñas que no son VLP.

- 15 Otro aspecto de la divulgación se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido quimérico L1/L2 como se describió anteriormente. Estos ácidos nucleicos se pueden presentar en un factor de expresión procariótico o eucariótico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, por ejemplo, el baculovirus recombinante. Los ácidos nucleicos recombinantes, por ejemplo, los
- 20 vectores de expresión, se pueden introducir (por ejemplo, infectar, transfectar, o transformar) en células huéspedes. Estas células huéspedes también son una característica de esta divulgación. Estas células huéspedes se pueden usar para producir los polipéptidos quiméricos L1/L2, por ejemplo, mediante la replicación de la célula
- 25 huésped bajo condiciones convenientes para la expresión del

polipéptido recombinante. Opcionalmente, el polipéptido puede entonces aislarse y/o purificarse, por ejemplo antes de la formulación en una composición inmunogénica.

5 Cualquiera de los polipéptidos quiméricos L1/L2 descritos en la presente se puede usar en la medicina, por ejemplo, como las composiciones inmunogénicas (tales como vacunas) para la prevención o el tratamiento de la infección o la enfermedad causada por el virus de papiloma humano. Estas composiciones son convenientes para su uso en método para inducir anticuerpos contra
10 el virus de papiloma humano en los humanos administrando la composición inmunogénica a un sujeto humano. De manera favorable, la administración de la composición inmunogénica al sujeto humano induce anticuerpos que previenen, mejoran o tratan la infección o la enfermedad por virus de papiloma humano.

15 De este modo, la presente divulgación también proporciona composiciones inmunogénicas para su uso en la prevención, mejoramiento o tratamiento de infección o enfermedad por virus de papiloma humano. Esta composición inmunogénica incluye un polipéptido quimérico L1/L1 (por ejemplo una proteína), capsómero o
20 partículas parecidas a virus (VLP) como se describió anteriormente, en combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición inmunogénica también incluye un adyuvante. Los adyuvantes convenientes incluyen una sal de aluminio, tal como
25 hidróxido de aluminio, y/o un 3-desacilado monofosforilo lípido A

(3D-MPL).

En una modalidad, las composiciones incluyen: (i) cuando menos una partícula parecida a virus (VLP) que comprende o consiste en un polipéptido L1 de virus de papiloma humano (HPV) o
5 fragmento del mismo; (ii) cuando menos un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido L1 de virus de papiloma humano (HPV) o fragmento del mismo en el cual se ha insertado cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2. Cualquiera de los polipéptidos quiméricos L1/L2 descritos en la presente
10 (incluyendo los ensamblajes supramoleculares, las partículas de polipéptido, capsómeros y/o partículas parecidas a virus (VLP) mencionados anteriormente) es conveniente para su uso en composiciones que contienen partículas parecidas a virus (VLP) en combinación con polipéptido quiméricos L1/L2.

15 En una modalidad, las partículas parecidas a virus para su uso en combinación con el polipéptido quimérico L1/L2 consiste en los polipéptidos L1 o fragmentos de los mismos. En modalidades específicas, las partículas parecidas a virus de HPV L1 son HPV 16 y/o HPV 18 L1 VLP. De manera similar, los polipéptidos quiméricos
20 también pueden incluir un polipéptido HPV 16 L1 o fragmento del mismo y/o un polipéptido HPV 18 L1 o fragmento del mismo.

En una modalidad una composición así en una modalidad ejemplar incluye cuando menos un polipéptido quimérico de (ii) que consiste en un polipéptido HPV 16 L1 o fragmento del mismo, un
25 polipéptido HPV 18 L1 o fragmento del mismo, o tanto un polipéptido

HPV 16 L1 o fragmento del mismo como un polipéptido HPV 18 L1 o fragmento en el cual se ha insertado un péptido L2 del mismo. Como se describe anteriormente, los péptidos quiméricos pueden incluir un polipéptido L1 con una supresión en el extremo C de uno o más aminoácidos del polipéptido L1. En una modalidad específica, la composición inmunogénica, incluye tanto HPV 16 L1 VLP como HPV 18 L1 VLP, y los polipéptidos quiméricos con tanto un polipéptido HPV 16 L1 como un polipéptido HPV 18 L1. En una modalidad así, el polipéptido quimérico con el polipéptido HPV 16 L1 y el polipéptido quimérico con el polipéptido HPV 18 pueden incluir diferentes péptidos L2. Los fragmentos de L1 ejemplares incluyen HPV 16 L1 desprovisto de 34 aminoácidos en el extremo C o HPV 18 L1 desprovisto de 35 aminoácidos en el extremo C.

De manera similar, en otra modalidad, la composición inmunogénica puede incluir una combinación de dos o más polipéptidos quiméricos que incluyen un polipéptido L1 de virus de papiloma humano (HPV) o un fragmento del mismo con cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1. Por ejemplo, la combinación puede incluir polipéptidos quiméricos con el mismo o diferente componente L1. De manera similar, los polipéptidos quiméricos en la combinación pueden incluir los mismos o diferentes componentes L2. En una modalidad específica, los polipéptidos quiméricos comprenden polipéptidos L1 del mismo tipo de virus de papiloma humano y los péptidos L2 son diferentes.

En formulaciones ejemplares, las composiciones inmunogénicas incluyen entre 10 y 50 microgramos de cada uno de las partículas parecidas a virus y/o polipéptidos quiméricos por dosis humanas. En una modalidad, cada partículas parecidas a virus y/o polipéptido quimérico está presente en una cantidad de aproximadamente 20 microgramos.

Las composiciones inmunogénicas como se describe en la presente se pueden preparar combinando cuando menos un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido L1 de virus de papiloma humano (HPV) o un fragmento del mismo con cuando menos un péptido insertado que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1, con cuando menos otro polipéptido quimérico, o con cuando menos una partícula parecida a virus (VLP) L1 del virus de papiloma humano (HPV), junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante.

TÉRMINOS

Con el fin de facilitar la revisión de varias modalidades de esta divulgación, se proporciona la siguiente explicación de los términos. Términos adicionales y explicaciones se proporcionaran en el contexto de esta divulgación.

A menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la cual

pertenece esta divulgación. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y colaboradores (Editores), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (Editor), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos en singular "un", "uno", "una" y "él", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente indique lo contrario. De manera similar la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto claramente indique otra cosa. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Se entenderá además que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácidos, y todos los pesos moleculares o valores de masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan por descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas dadas con respecto a las concentraciones o niveles de una sustancia, tales como un antígeno, pretenden ser aproximadas. De este modo, cuando se indica una concentración que es cuando menos (por ejemplo) 200 picogramos, se pretende que la concentración estará cuando menos aproximadamente (o "alrededor de" o "~) 200 picogramos.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente se pueden usar en la práctica o en la prueba

de esta divulgación, más adelante se describen métodos y materiales convenientes. El término "comprende" significa "incluye". De este modo, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un compuesto o composición mencionado (por ejemplo ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o paso, o grupo de compuestos o pasos, pero no la exclusión de algún otro compuesto, composición, pasos o grupos de los mismos. La abreviación "v.gr." se deriva del latín verbigracia y se usa aquí para indicar un ejemplo no limitante. De este modo la abreviación "v.gr." es sinónimo con el término "por ejemplo".

El término "virus de papiloma humano", abreviado "HPV" se refiere a los miembros del género virus de papiloma que son capaces de infectar a los humanos. Hay dos grupos importantes de virus de papiloma humano (el grupo genital cutáneo), cada uno de los cuales contiene múltiples "tipos" o "sepas" de virus (por ejemplo, HPV 16, HPV 18, HPV 33, HPV 58, etcétera) categorizados por su similitud genética. En el contexto de esta divulgación el término "tipo" se puede usar para designar un HPV y/o un polipéptido de un tipo especificado de HPV. Cuando se antecede del término "no", el HPV designado o polipéptido es cuando menos otro o un tipo adicional de virus de papiloma humano que el referenciado. Por ejemplo, "polipéptido HPV tipo 18 L1" se refiere al polipéptido L1 del HPV tipo 18. En cambio, "polipéptido no HPV tipo 18 L1" se refiere a un polipéptido L1 de cualquier tipo distinto del HPV tipo 18.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero en el cual los monómeros son residuos de aminoácidos que están unidos entre sí a través de enlaces amida. Los términos "polipéptido" o "proteína" como se usan en la presente pretenden abarcar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como las glicoproteínas. El término "polipéptido" pretende específicamente cubrir las proteínas que se presentan de manera natural así como aquellas se producen de manera recombinante o sintéticamente. El término "fragmento", en referencia a un polipéptido, se refiere a una porción (esto es una subsecuencia) de un polipéptido. El término "fragmento inmunogénico" se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que retienen cuando menos un epítipo inmunogénico predominante de la proteína o polipéptido de referencia de longitud completa. La orientación dentro de un polipéptido generalmente se recita en una dirección del extremo N al extremo C, definido por la orientación de las fracciones amino y carboxilo de los aminoácidos individuales. Los polipéptidos se traducen del extremo N o amino hacia el término C o carboxilo.

Los términos "polinucleótido" y "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cuando menos 10 bases de longitud. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, o formas modificadas de cualquiera de esos nucleótidos. Los términos incluyen formas sencillas y dobles de ADN. Por "polinucleótido aislado" queremos decir un polinucleótido que no está inmediatamente contiguo con las secuencias de codificación con

las cuales está inmediatamente contigua (uno del extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma que se presenta naturalmente del organismo del cual se deriva. En una modalidad, un polinucleótido codifica un polipéptido. La dirección 5' y 3' de un ácido nucleico se define haciendo referencia a la conectividad de las unidades de nucleótidos individuales, y se designa de acuerdo con las posiciones del carbono del anillo de azúcar o desoxirribosa (o ribosa). El contenido de información (codificación) de una secuencia de polinucleótidos se lee en una dirección de 5' a 3'.

10 El término "heterólogo" con respecto a un ácido nucleico, un polipéptido u otro componente celular, indican que el componente se presenta donde no se encuentra normalmente en la naturaleza y/o que se origina de una fuente o especie diferente.

15 Los términos "natural" y "que se presenta naturalmente" se refieren a un elemento, tal como una proteína, polipéptido o ácido nucleico, que está presente en el mismo estado como lo está en la naturaleza. Esto es, el elemento no ha sido modificado artificialmente. Se entenderá, que en el contexto de esta divulgación, hay numerosos tipos natural/que se presenta naturalmente de virus de papiloma humano (y proteínas HPV y polipéptidos), por ejemplo, obtenidos de tipos de virus de papiloma humano que se presentan naturalmente diferentes.

20 Una "variante" cuando se refiere a un ácido nucleico o a un polipéptido (por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido L1 o L2 del virus de papiloma humano) es un ácido nucleico o un polipéptido que

25

difiere de un ácido nucleico o polipéptido de referencia. Usualmente, la o las diferencias entre el variante y el ácido nucleico o polipéptido de referencia constituye un número proporcionalmente pequeño de diferencias en comparación con el referente. Un ácido nucleico variante puede diferir del ácido nucleico de referencia con el cual se compara por la adición, supresión o sustitución de uno o más nucleótidos, o por la sustitución de un análogo de nucleótido artificial. De manera similar, un polipéptido variante puede diferir del polipéptido de referencia al cual se compara por la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos, o por la sustitución de un análogo de aminoácido.

Un "antígeno" es un compuesto, composición, o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos y/o una respuesta de células T en un animal, incluyendo las composiciones que se inyectan, absorben o de otro modo se introducen en un animal. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio o un antígeno al cual responden las células B y/o T. Los "epítopos antigénicos dominantes" o "epítipo dominante" son aquellos epítopos a los cuales una respuesta inmunitaria de anfitrión funcionalmente significativa, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo o una respuesta de célula T, se hace. De este modo, con respecto a una respuesta inmunitaria protectora contra un patógeno, los epítopos antigénicos dominantes son aquellas fracciones que cuando son reconocidas por el sistema inmune huésped dan como

resultado la protección de la enfermedad causada por el patógeno. El término "epítipo de célula T" se refiere a un epítipo que cuando se enlaza a una molécula de MHC apropiada se enlaza específicamente por una célula T (vía un receptor de célula T). Un "epítipo de célula B" es un epítipo que específicamente se enlaza por un anticuerpo (o molécula receptora de célula B).

Una "respuesta inmunitaria" es una respuesta de una célula del sistema inmune. Tal como una célula B, célula T, o monocito, a un estímulo. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta a una célula B, que da como resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos que neutralizan un específico antígeno. Una respuesta inmunitaria también puede ser una respuesta de célula T, tal como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno particular (esto es una respuesta "específica de antígeno"). Si el antígeno se deriva de un patógeno, la respuesta específica de antígeno es una "respuesta específica de patógeno". Una "respuesta inmunitaria protectora" es una respuesta inmunitaria que inhibe una función o actividad perjudicial de un patógeno, reduce la infección por un patógeno, o disminuye los síntomas (incluyendo la muerte) que son resultado de la infección por el patógeno. Una respuesta inmunitaria protectora se puede medir, por ejemplo, mediante la inhibición de la réplica viral o formación de placa en un ensayo de reducción de placa o ensayo de neutralización (ELISA), o midiendo la resistencia a un estímulo de patógeno *en vivo*.

Un "adyuvante" es un agente que aumenta la producción de una respuesta inmunitaria de una manera específica. Los adyuvantes comunes incluyen suspensiones de minerales (alum, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) sobre el cual se adsorbe el antígeno; 5 emulsiones, incluyendo agua en aceite, aceite en agua (y variantes de las mismas, incluyendo emulsiones dobles y emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmuno-estimuladores (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas receptores tipo Toll (particularmente TLR2, TLR4, TLR7/8 10 y TLR9 agonistas), y varias combinaciones de estos componentes.

Una "composición inmunogénica" es una composición de materia conveniente para la administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, en un escenario experimental) que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica, por ejemplo, contra 15 un patógeno, tal como el virus de papiloma humano. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, subunidades antigénicas de virus, por ejemplo, polipéptidos de los mismos) o epítopos antigénicos. Una composición inmunogénica también puede incluir uno o más componentes 20 adicionales capaces de provocar o aumentar una respuesta inmunitaria, tal como un excipiente, vehículo, y/o adyuvante. En ciertos casos, las composiciones inmunogénicas se administran para provocar una respuesta inmunitaria que protege al sujeto contra síntomas condiciones inducidas por un patógeno. En algunos casos, 25 los síntomas o la enfermedad causado por un patógeno se previene

(o trata, por ejemplo, se reduce o mejora) inhibiendo la réplica del patógeno (por ejemplo, del virus de papiloma humano) después de la exposición del sujeto al patógeno. Por ejemplo, en el contexto de esta divulgación, se pretenden ciertas modalidades de composiciones inmunogénicas para la administración a un sujeto o población de sujetos con el propósito de provocar una respuesta inmunitaria protectora o paliativa contra el virus de papiloma humano son composiciones de vacuna o vacunas.

10 POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS L1/L2

La presente invención se dirige a los polipéptidos que se pueden formular en composiciones de vacuna, y que satisfacen la necesidad de una composición de vacuna segura y efectiva para proporcionar protección contra la infección y/o la enfermedad por virus de papiloma humano y que difieren de las vacunas comercialmente disponibles actualmente. En particular, la presente invención se refiere a los polipéptidos quiméricos que incluyen un polipéptido HPV L1 en el cual se ha infectado cuando menos un péptido que incluye un epítipo antigénico de un polipéptido HPV L2.

20 Los polipéptidos L1 y L2 del virus de papiloma humano descritos en la presente pueden ser de cualquier genotipo del virus de papiloma humano incluyendo en particular los tipos de virus de papiloma humano que causan cáncer de alto riesgo HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ó 73 y las verrugas genitales que causan tipos de virus de papiloma humano tales como

HPV 6 u 11 y los tipos que causan en la piel tales como los tipos HPV5 y HPV8 o aún los tipos 2 y 3 asociados con las verrugas comunes, y HPV76 asociada con las verrugas cutáneas benignas.

Por ejemplo, en una modalidad la presente invención
5 proporciona un polipéptido L1 tipo 18 de virus de papiloma humano (HPV) o un fragmento del mismo que comprende cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1. Un epítipo de un polipéptido L2 es un
10 péptido que cuando se presenta adecuadamente es capaz de inducir una respuesta inmunitaria que reconocerá un polipéptido L2 natural (por ejemplo, de longitud completa) de un virus de papiloma humano, por ejemplo, un virus de papiloma humano que se presenta naturalmente.

En otra modalidad se proporciona un polipéptido L1 tipo 16 de
15 virus de papiloma humano (HPV) o fragmento del mismo que comprende cuando menos un péptido que comprende los aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2.

El polipéptido L1 puede ser un polipéptido L1 de longitud completa. En ciertas modalidades, el polipéptido L1 es un fragmento
20 de L1, tal como un fragmento truncado por la supresión de uno o más aminoácidos del extremo N o el C. De conformidad con lo anterior, en ciertas modalidades, los polipéptidos L1 son truncados de los cuales uno o más aminoácidos se remueven de uno o ambos extremos en comparación con la proteína natural (esto es la proteína
25 como se encuentra en la naturaleza). En una modalidad particular, el

polipéptido L1 tiene una supresión en el extremo C. En la Figura 1a se da una secuencia de ejemplo de HPV 16 L1. En la Figura 1b se da una secuencia de ejemplo de HPV 18 L1.

Las proteínas L1 truncadas pueden ser capaces de
5 autoensamble, por ejemplo, en capsómeros o partículas parecidas a virus. Las partículas parecidas a virus típicamente se parecen al virus de papiloma humano bajo el microscopio electrónico. Típicamente están conformadas por 72 capsómeros que a su vez están hechos de 5 polipéptidos L1 en una unidad pentamérica.
10 Convenientemente cuando menos una de las proteínas L1 utilizadas en la presente, comprenden una proteína truncada L1, y donde múltiples proteínas parecidas a virus, polipéptidos quiméricos o capsómeros de virus de papiloma humano están presentes, convenientemente todas las proteínas L1 en la composición son
15 proteínas L1 truncadas. Convenientemente el truncamiento remueve una señal de localización nuclear. Conveniente el truncamiento es un truncamiento en el extremo C. Convenientemente el truncamiento en el extremo C remueve menos de 50 aminoácidos, por ejemplo menos de 40 aminoácidos. En una modalidad particular el truncamiento en
20 el extremo C remueve 34 aminoácidos de los aminoácidos 16 y 35 del virus de papiloma humano del HPV 18.

Las proteínas L1 truncadas empleadas en la presente son proteínas L1 convenientemente funcionales derivadas o variantes. Las derivadas o variantes de proteína L1 funcionales son capaces de
25 despertar una respuesta inmunitaria (opcionalmente, cuando se

adyuvan adecuadamente), siendo capaz esta respuesta inmunitaria de reconocer un virus que comprende la proteína L1 de longitud completa (o la partículas parecidas a virus que consiste en) y/o el tipo de virus de papiloma humano del cual se derivó la proteína L1.

5 La ubicación del péptido L2 en el polipéptido HPV L1 quimérico descrito en la presente es importante.

En cualquier modalidad descrita en la presente el péptido L2 se puede localizar en uno de los lazos expuestos del brazo invasor del extremo C de la proteína L1. Los lazos y el brazo invasor se
10 encuentran cuando el L1 está en forma de capsómero o partículas parecidas a virus (Chen y colaboradores 2000 Mol Cell 5, 557-567).

En cualquier modalidad descrita en la presente el péptido L2 se puede localizar en una posición seleccionada de las regiones siguientes de la secuencia L1, en donde las ubicaciones se
15 relacionan con el HPV 16 y la secuencia de referencia L1 del HPV 18 mostrada en la Figura 1, o en una posición equivalente en otra secuencia de HPV L1:

- (i) El lazo BC en los aminoácidos 50-61
- (ii) El lazo DE en los aminoácidos 132-142, por ejemplo los
20 aminoácidos 132-141, particularmente los aminoácidos 137-138
- (iii) El lazo EF en los aminoácidos 172-182, por ejemplo 176-
182, particularmente 176-179
- (iv) El lazo FG en los aminoácidos 271-290, por ejemplo 272-
275, particularmente 272-273
- 25 (v) El lazo HI en los aminoácidos 345-359, por ejemplo 347-

350, particularmente 349-350

(vi) El brazo del extremo C en los aminoácidos 429-445, por ejemplo 423-440, particularmente 423-424, 431-433, o 437-438 para el HPV 16, y 42-425, 432-433 ó 439-440 para el HPV 18.

5 En cualquier modalidad descrita en la presente el péptido HPV L2 se puede insertar en la secuencia L1 sin remover los aminoácidos de L1. Alternativamente el péptido L2 se puede insertar en la secuencia L1 con la remoción de uno o más aminoácidos de la secuencia L1 en la posición de inserción, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6,
10 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 aminoácidos de la secuencia L1 se puede remover en el lugar donde se inserta el péptido L2. De este modo el péptido L2 se puede sustituir por uno o más aminoácidos en la secuencia L1, por ejemplo el péptido L2 puede remplazar una secuencia de L1 de longitud equivalente a la
15 secuencia del péptido L2.

 Cuando están presentes dos o más péptidos L2 en un polipéptido quimérico L1/L2, estos pueden ser péptidos L2 diferentes del mismo tipo de virus de papiloma humano, o pueden ser péptidos de diferentes tipos de virus de papiloma humano en cuyo caso
20 pueden ser de la región correspondiente en los tipos de virus de papiloma humano diferentes.

 En una modalidad, el péptido L2 se inserta en un sitio que permite el ensamble de un ensamble supramolecular de polipéptidos quiméricos, por ejemplo en partículas de polipéptido, tales como
25 capsómeros o partículas parecidas a virus (VLP) o estructuras

pequeña no partículas parecidas a virus. Por ejemplo, para mantener la estructura de VLP, el péptido L2 se inserta en el polipéptido L1 en un sitio que no interfiere con los sitios que participan en la formación de puentes disulfuro que están involucrados en mantener interacciones intercapsómero y de este modo la conformación de partículas parecidas a virus (VLP). Estas estructuras supramoleculares se pueden valorar mediante microscopía electrónica, por ejemplo, como se describe por Sadeyen y colaboradores 2003, *Virology* 309, 32-40; Slupetzky y colaboradores, 2007 *Vaccine* 25, 2001-2010, Varsani y colaboradores 2003, *J of Virology* 77, 8386-8393, Chen y colaboradores 2000, Deschuyteneer M y colaboradores 2010, *Human Vaccines* 6; 5, 407-419. Típicamente, las partículas parecidas a virus quiméricas son de un tamaño similar o idéntico en comparación con las partículas parecidas a virus naturales, esto es, las partículas parecidas a virus en las cuales la proteína L1 tiene longitud completa o está truncada, pero no contiene un péptido L2. Las partículas parecidas a virus quiméricas pueden estar en un intervalo de variación de 50 nanómetros de diámetro. En modalidades alternativas las estructuras pequeñas no partículas parecidas a virus de entre 20 y 35 nanómetros en diámetro se forman.

El sitio en el cual se inserta el péptido L2 puede permitir la presencia de epítopos neutralizantes dependientes de la conformación que se mantenga. Los péptidos neutralizantes se pueden detectar usando anticuerpos monoclonales tales como V5,

H16, E70 y U4 para el virus de papiloma humano 16 (Christensen y colaboradores 2001, Carter y colaboradores 2003, 2006, Day y colaboradores, 2007) y J4 para HPV 16 (Combita y colaboradores 2002). Los epítomos neutralizantes adicionales se conocen en la
5 técnica y su presencia o ausencia se puede identificar de manera semejante utilizando anticuerpos monoclonales.

Sin embargo, el mantenimiento de los epítomos neutralizantes L1 en el polipéptido L1 puede no ser necesario, por ejemplo especialmente en las composiciones descritas en la presente que
10 también contienen partículas parecidas a virus L1 no quiméricas. Los sitios convenientes para la inserción del péptido L2 exponen el péptido L2 en la superficie del polipéptido L1 particularmente cuando se presentan como partículas parecidas a virus, por ejemplo los sitios mostrados en la Tabla 1.

15 Las tablas 1 y 2 muestran las regiones expuestas de HPV L1 (Carter u colaboradores 2003, Bishop y colaboradores 2007, Chen y colaboradores 2000) las cuales pueden proporcionar sitios de inserción adecuados para el péptido L2, y las regiones hipervariables dentro de aquellas regiones. Convenientemente el péptido L2 se
20 inserta en el brazo invasor del extremo C, o en el lazo DE o en el lazo FG o en el lazo HI. Convenientemente el péptido L2 se inserta en la región hipervariable del lazo o el brazo del extremo C. Las regiones mostradas en la Tabla 1 son para el HPV 16; se pueden identificar regiones similares en L1 de otros tipos de virus de
25 papiloma humano y se definen para el HPV 18 L2 en la tabla 2.

Tabla 1

Lazos expuestos a HPV L1 para HPV16

5	Posición de la región hipervariable dentro de los lazos en la secuencia L1	Nombre del Lazo
	AA 50-61	Lazo BC
	AA 132-142	Lazo DE
10	AA 172-182	Lazo EF (Puente de Capsómeros: Cis 175 y Cis 428)
	AA 271-290	Lazo FG
	AA 345-359	Lazo HI
15	AA 429-445	Brazo Invasor Extremo C (Ct)

Tabla 2

Lazos expuestos a HPV 18 L1

20	Posición de la región hipervariable dentro de los lazos en la secuencia L1	Nombre del Lazo
		Lazo BC
25	AA 132-142	Lazo DE

5

10

Posición de la región hipervariable dentro de los lazos en la secuencia L1	Nombre del Lazo
	Lazo EF (Puente de Capsómeros: Cis 175 y Cis 428)
AA 271-290	Lazo FG
AA 345-359	Lazo HI
AA 429-445	Brazo Invasor Extremo C (Ct)

15

20

25

Puede ser ventajoso en un polipéptido, capsómero, o partículas parecidas a virus L1 quimérica descrita en la presente insertar un péptido L2 dentro o en la región de un epítipo inmunodominante, tal como el epítipo de HPV 16 reconocido por el anticuerpo monoclonal V5. Esto puede dar como resultado que el epítipo inmunodominante pierda su inmunodominación de manera que otro epítipo L1 puede volverse inmunodominante, lo cual a su vez puede dar como resultado una protección cruzada mejor. Por ejemplo un péptido L2 insertado en el lazo FG en la región del epítipo reconocida por el anticuerpo V5 puede dar como resultado que el epítipo pierda su inmunodominación y un epítipo subdominante se vuelva inmunodominante.

Cuando están presentes dos o más péptidos L2 en polipéptidos

separados (o capsómeros, o partículas parecidas a virus) en una composición descrita en la presente, los péptidos L2 pueden estar en el L1 de diferentes tipos de virus de papiloma humano, o en L1 del mismo tipo de virus de papiloma humano.

5 En una modalidad que comprende dos o más péptidos L2 en un polipéptido (o capsómero partículas parecidas a virus), los péptidos L2 se pueden insertar en el mismo sitio o en diferentes sitios en la secuencia de L1. Cuando los péptidos L2 se insertan en el mismo sitio, esto puede ser en el mismo lazo y puede ser en la misma
10 región hipervariable del mismo lazo. Puede ser ventajoso tener un corto tramo de aminoácidos entre los péptidos L2 por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos entre los péptidos L2.

 Los péptidos L2 se seleccionan para incluir cuando menos un epítipo antigénico. El epítipo seleccionado (como incorporado en un
15 polipéptido L1) generalmente es capaz de provocar una respuesta inmunitaria a cuando menos un polipéptido L2 natural, tal como un polipéptido L2 que incluye los aminoácidos presentes en el epítipo seleccionado. De manera favorable, el polipéptido quimérico L1/L2 es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra cuando
20 menos una proteína L2 natural adicional.

 Los péptidos L2 para su uso como se describe en la presente se pueden seleccionar de los siguientes péptidos:

 Un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 17-36 de L2,

25 Un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 56-75

de L2,

Un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 96-115

de L2,

Un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 108-

5 120 de L2,

Por ejemplo, los péptidos L2 para su uso como se describe en la presente se pueden seleccionar de los siguientes péptidos:

Un péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 17-36

de L2,

10 Un péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 56-75 de L2,

Un péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 96-115

de L2,

Un péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 108-

15 120 de L2,

La Figura 3 muestra la secuencia de HPV L2 para los péptidos HPV16 L2 de las posiciones 17 a 36, 56 a 75, 96 a 115 y 108 a 120 de la secuencia de aminoácidos de L2, y para los péptidos L2 de la región correspondiente de otros tipos diferentes de virus de papiloma humano. Las secuencias disponibles en la literatura para otros tipos de virus de papiloma humano conocidos se pueden usar para diseñar los péptidos L2 correspondientes a partir de tipos de virus de papiloma humano adicionales de acuerdo con la secuencia del HPV 16 L2 como secuencia de referencia (véase SwissProt (Boeckmann y colaboradores, 2003) o Genbank (Benson y colaboradores, 2008)).

20

25

A lo largo de la memoria descriptiva la secuencia de L2 del virus de papiloma humano 16 se usa como la secuencia de referencia para determinar la región a partir de la cual se deriva la secuencia de L2. La numeración comienza en el aminoácido 1 en el extremo N, con el término N del lado izquierdo de cualquier secuencia que aparezca en la presente y el extremo C a la derecha. La numeración real para ciertos péptidos equivalentes de otros tipos de virus de papiloma humano también se da, en las listas de péptidos específicos más adelante.

De manera conveniente el péptido L2 comprende o consiste en el péptido L2 56-75, opcionalmente modificado como se describe en la presente, por ejemplo SEQ ID NO: 8-15, o SEQ ID NO: 29. El péptido L2 56-75 muestra identidad de secuencia sustancial, es decir, homología, entre los tipos de virus de papiloma humano.

Los péptidos L2 de acuerdo con la presente memoria descriptiva pueden comprender o consisten en uno o más, o dos o más de las secuencias representadas por SEQ ID NO: 1 a 31.

El o los péptidos L2 se pueden seleccionar del segmento de aminoácidos entre los aminoácidos 17-36 (por ejemplo, 20 mers), por ejemplo:

Tipo 16:	17-QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV-36	[SEQ ID NO: 1]
Tipo 52:	16-QLYQTCKASGTCPDVIPKV-35	[SEQ ID NO: 2]
Tipo 51:	16-QLYSTCKAAGTCPPDVVNKV-35	[SEQ ID NO: 3]
Tipo 6:	15-QLYQTCKATGTCPDVIPKV-34	[SEQ ID NO: 4]
Tipo 11:	15-QLYQTCKATGTCPDVIPKV-34	[SEQ ID NO: 5]

Tipo 31: 17-QLYQTCKAAGTCPSDVIPKI-36 [SEQ ID NO: 6]
 Tipo 45: 16-DLYRTCKQSGTCPPDVINKV-35 [SEQ ID NO: 7]
 Tipo 5: 17-HIYQTCKQAGTCPPDVINKV-36 [SEQ ID NO: 33]
 Tipo 56: 17-QLYKTCKLSGTCPEDVVNKI-36 [SEQ ID NO: 34]

5

El o los péptidos L2 también se pueden seleccionar del segmento de aminoácidos entre los aminoácidos 56-75 (por ejemplo, 20 mers), por ejemplo:

Tipo 16: 56-GGLGIGTGSGTGGRTGYIPL-75 [SEQ ID NO: 8]
 10 Tipo 6: 55-GGLGIGTGSGTGGRTGYVPL-74 [SEQ ID NO: 9]
 Tipo 31: 56-GGLGIGSGSGTGGRTGYVPL-75 [SEQ ID NO: 10]
 Tipo 33: 55-GGLGIGTGSGSGGRTGYVPI-74 [SEQ ID NO: 11]
 Tipo 45: 55-GGLGIGTGSGSGGRTGYVPL-74 [SEQ ID NO: 12]
 Tipo 11: 55-GGLGIGTGAGSGGRAGYIPL-74 [SEQ ID NO: 13]
 15 Tipo 35: 56-GGLGIGSGSGTGGRSGYVPL-75 [SEQ ID NO: 14]
 Tipo 52: 55-GGLGIGTGAGSGGRAGYVPL-74 [SEQ ID NO: 15]
 Tipo 5: 56-GGLGIGTGSGTGGRTGYVPL-75 [SEQ ID NO: 35]

El o los péptidos L2 también pueden ser más cortos de 20 aminoácidos, por ejemplo, los péptidos L2 pueden tener cualquier número de aminoácidos mayor que o igual a 8 aminoácidos, tales como 9 aminoácidos, 10 aminoácidos, 11 aminoácidos, 12 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, o hasta 30 aminoácidos (o un número entero de aminoácidos entre 8 y 30). Por
 25 ejemplo, el péptido L2 puede tener un segmento de 8 aminoácidos

entre los aminoácidos 56-75, tales como los siguientes ejemplos de 8 mer.

Tipo 16: 56-GGLGIGTG-63 [SEQ ID NO: 29]

5 El o los péptidos L2 también se pueden seleccionar del segmento de aminoácidos entre los aminoácidos 96-114 (por ejemplo, 20 mers), por ejemplo:

Tipo 6: 95-EPVAPSDPSISVSLIEESAI-114 [SEQ ID NO: 16]

Tipo 52: 95-EPIGGLEPSIVSMIEETTFI-114 [SEQ ID NO: 17]

10 Tipo 31: 96-DPVGPLDPSIVSLVEESGIV-115 [SEQ ID NO: 18]

Tipo 16: 96-DPVGPSDPSIVSLVEETSFI-115 [SEQ ID NO: 19]

Tipo 58: 95-DTVGPLDSSIVSLIEESSFI-114 [SEQ ID NO: 20]

Tipo 45: 94-EPVGPTDPSIVTLVEDSSVV-113 [SEQ ID NO: 21]

15 El o los péptidos también se pueden del segmento de aminoácidos entre los aminoácidos 108-120 (por ejemplo, 13 mers), por ejemplo:

Tipo 16: 108-LVEETSFIDAGAP-120 [SEQ ID NO: 22]

Tipo 18: 106-LIEDSSVVTSGAP-118 [SEQ ID NO: 23]

20

Cualquiera de los péptidos anteriores se pueden modificar, mediante la adición, supresión o sustitución de cuando menos un aminoácido, por ejemplo, mediante la adición, supresión o sustitución de uno, dos o varios aminoácidos. Por ejemplo en el
25 péptido L2 17-36 la región (22-28) entre las dos cisteínas y una o

ambas de las cisteínas se pueden suprimir. Esta modificación se muestra para los péptidos hpv16 (SEQ ID NO: 24 y 25). En otro ejemplo la valina (V) localizada a cuatro aminoácidos desde el extremo C (es decir, la posición 32) del péptido HPV tipo 51 17-36 se puede sustituir con una isoleucina (I) que es el aminoácido encontrado en esta posición en todos los otros tipos de virus de papiloma humano mostrados anteriormente.

En otro ejemplo el péptido L2 de 56-75 se puede reducir de tamaño (por ejemplo, como en la SEQ ID NO: 29) a condición de que la región GGLGI (SEQ ID NO: 32) en el extremo C se mantengan debido a que se ha demostrado que es importante para la reactividad cruzada entre diferentes tipos de virus de papiloma humano (Kondo y colaboradores, 2007). De este modo un péptido L2 como se describe en la presente puede comprender la secuencia GGGLGI.

Opcionalmente, un espaciador de uno o más aminoácidos, tal como los residuos de glicina, se pueden incluir también en el extremo N o en el extremo C del péptido L2. Por ejemplo los péptidos además pueden comprender uno o dos o tres aminoácidos espaciadores añadidos por ejemplo uno o dos o tres residuos de aminoácidos añadidos al extremo amino o el extremo carboxilo (o entre péptidos enlazados en donde están presentes dos o más péptidos L2). Generalmente el espaciador no tendrá actividad biológica específica distinta de unir al péptido inmunogénico a la secuencia de L1, o preservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellos. Un espaciador puede ser necesario o útil para

retener la conformación correcta del L1 VLP y/o una presentación efectiva o mejorada del péptido L2 insertado en comparación con la ausencia de un espaciador.

5 Cualquiera de los péptidos anteriores se puede modificar, por ejemplo, mediante la inserción (adición), supresión o sustitución de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, los péptidos L2 pueden incorporar aminoácidos que difieren de la secuencia L2 de la secuencia HPV L2 natural (esto es, que se presenta naturalmente). Por ejemplo, los péptidos pueden tener uno o dos inserciones de
10 aminoácidos o sustituciones dentro de la secuencia, o una supresión de uno o dos o varios aminoácidos por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o hasta 10 aminoácidos en comparación con la secuencia natural por ejemplo para remover la ocurrencia de un enlace disulfuro entre dos cisteínas y/o la región entre las cisteínas. En ejemplos específicos,
15 las modificaciones presentes en los péptidos L2 de la presente memoria descriptiva, en relación con una secuencia L2 natural, se limitan a 1 ó 2 inserciones de aminoácidos, supresiones, o sustituciones, y/o la supresión de hasta 10 aminoácidos contiguos entre dos residuos de cisteína.

20 Cuando las modificaciones a la secuencia de L2 se hacen en los péptidos descritos en la presente, estas modificaciones se pueden limitar de manera que una proporción sustancial o cuando menos el 50 por ciento o cuando menos el 70 por ciento o cuando menos el 90 por ciento o cuando menos el 95 por ciento de los
25 aminoácidos en el péptido corresponden a los aminoácidos en la

secuencia L2 natural.

De manera alternativa, o adicionalmente, cualquier péptido L2 particular puede ser una quimera de dos o tres o más péptidos L2 como se describe en la presente. En el caso de cualquiera de estas
5 modificaciones a la secuencia L2, el carácter inmunogénico de la secuencia L2 se mantiene. Esto es, el epítipo o epítipos de L2 dentro del péptido que provoca la respuesta inmunitaria deseada se mantiene. El propósito de las modificaciones puede ser mejorar las propiedades del péptido L2 por ejemplo para mejorar la reactividad
10 cruzada con L2 de otros tipos de virus de papiloma humano.

De este modo los péptidos L2 se pueden seleccionar a partir de los siguientes péptidos:

(a) un péptido correspondiente a los residuos de aminoácidos 17-36 de L2 que comprende una o más adiciones, supresiones y/o
15 sustituciones de aminoácidos;

(b) un péptido correspondiente a los residuos de aminoácidos 56-75 de L2 que comprende una o más adiciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos;

(c) un péptido correspondiente a los residuos de aminoácidos 96-115 de L2 que comprende una o más adiciones, supresiones y/o
20 sustituciones de aminoácidos;

(d) un péptido correspondiente a los residuos de aminoácidos 108-120 de L2 que comprende una o más adiciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos; en donde la una o más inserciones,
25 supresiones y/o sustituciones son comparadas a un polipéptido L2

natural.

Los siguientes son ejemplos de péptidos L2 con modificaciones.

Tipo 16: 17-QLYKTCPPDVIPKV-36 [SEQ ID NO: 24]

5 (sin región variable (23-28) entre 2 cisteínas y suprimiendo una cisteína)

Tipo 16: 17-QLYKTCPPDVIPK-36 [SEQ ID NO: 25]

Sin región variable entre 2 cisteínas, suprimiendo una cisteína y
sustituyendo Ile con Val en la posición 32 (I32V)

10 Tipo 16: 17-QLYKTCKQAGTCPPDVIPKV-36 [SEQ ID NO: 26]
(conteniendo I32V)

Tipo 51: 16-QLYSTCKAAGTCPPDVINKV-35 [SEQ ID NO: 27]
(conteniendo V33I)

15 Tipo 45: 16-DLYRTCKQSGTCPPDVIPKV-35 [SEQ ID NO: 28]
(conteniendo N34P)

20 El péptido L2 también puede ser un concatámero seleccionado a partir de dos diferentes segmentos de aminoácidos, por ejemplo, de los aminoácidos 17-36 y de los aminoácidos 56-75 (20 mers) por ejemplo:

Tipo 16: 17-QLYKTPPDIIPKVGGLGIGTG-63 [SEQ ID NO: 30]

Tipo 16: 17-QLYKTPPDVIPKVGGLGIGTG-63 [SEQ ID NO: 31]
(con I32V)

25 Los dos péptidos representados por SEQ ID NO: 30 y 31 son

quimeras de dos de los péptidos anteriores y contienen la región del péptido 17-36 sin ambas cisteínas y sin la región (22-28) entre las cisteínas, junto con la región 56-63 (conservada entre los virus de papiloma humano) a partir del péptido 56-75. Se puede construir un

5 péptido similar a partir de otros tipos de virus de papiloma humano.

Será evidente que cualquiera de los péptidos enlistados anteriormente se puede incluir en un HPV L1, polipéptidos, capsómeros, o partículas parecidas a virus como se describe en la presente, en cualquiera de los sitios en la secuencia de L1 como se

10 discutió en la presente.

Cuando está presente una pluralidad de péptidos L2 en una composición de acuerdo con la presente divulgación, esto puede ser dos o más diferentes péptidos L2 del mismo tipo de virus de papiloma humano, es decir péptidos de diferentes regiones

15 (incluyendo traslapes) de L2, o pueden ser dos o más péptidos L2 diferentes de la misma región o diferentes tipos de virus de papiloma humano por ejemplo en la región 17-36. Cuando están presentes más de dos péptidos L2 esto puede incluir tanto péptidos múltiples del mismo tipo de virus de papiloma humano como múltiples péptidos de

20 diferentes tipos de virus de papiloma humano.

Cuando están presentes dos o más péptidos L2 diferentes en una composición de acuerdo con la presente divulgación, cada péptido puede estar presente en un HPV L1 VLP de un diferente tipo de virus de papiloma humano por ejemplo HPV 16 y HPV 18 L1 VLP,

25 o pueden ser HPV L1 VLP del mismo tipo de virus de papiloma

humano por ejemplo el HPV 16 o HPV 18 L1 VLP. Los péptidos L2 convenientes descritos en la presente se presentan en las partículas parecidas a virus del virus de papiloma humano de HPV 16 y/o HPV 18.

5 De manera conveniente, en cualquier modalidad descrita en la presente, los péptidos L2 incluyen cuando menos 8 residuos de aminoácidos contiguos de la proteína L2. En cualquier modalidad descrita en la presente el péptido o los péptidos HPV L2 pueden tener hasta 30 residuos de aminoácidos de longitud.

10 En cualquier modalidad descrita en la presente, los péptidos L2 se pueden seleccionar de los aminoácidos 1-200 del extremo N de HPV L2, particularmente los aminoácidos 1-150 de HPV L2. De este modo los péptidos L2 pueden comprender 8 o más residuo de aminoácidos de la región 1-200 ó 1-150 de HPV L2, que pueden ser
15 8 o más residuos de aminoácidos contiguos de la región 1-200 ó 1-150.

El término "péptido L2 puede comprender cuando menos 8 residuos de aminoácidos", como se usa en la presente, se refiere a los péptidos de cualesquiera 8 o más aminoácidos derivados de L2, aunque los péptidos sean convenientemente cuando menos de 9, 10,
20 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más aminoácidos de longitud. En una modalidad los péptidos L2 de la presente divulgación son péptidos cortos de menos de 100 aminoácidos, convenientemente menos de 50 aminoácidos, o menos de 40 aminoácidos. Por ejemplo los
25 péptidos pueden tener hasta 30 aminoácidos de longitud, o hasta 20

ó 21 aminoácidos de longitud. La proteína L2 de longitud completa no se considera que sea un péptido de L2 en el contexto de los polipéptidos quiméricos L1/L2 divulgados en la presente.

5 El requerimiento mínimo de un péptido L2 en la presente divulgación es un péptido que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria a una proteína L2 natural. De este modo, los péptidos L2 típicamente incluyen cuando menos 8 aminoácidos contiguos de un polipéptido L2, e incluyen cuando menos un epítipo. Uno o más de los diferentes péptidos L2 en una composición de acuerdo a la
10 presente divulgación pueden tener hasta 25 aminoácidos o hasta 30 o hasta 40 aminoácidos de longitud. En una modalidad, todos los péptidos L2 diferentes usados en una composición de acuerdo a la presente divulgación tienen hasta 25 aminoácidos o hasta 30 o hasta 40 aminoácidos de longitud.

15 Los péptidos L2 de acuerdo con la presente divulgación son convenientemente capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra la infección por virus de papiloma humano homólogo, esto es, contra la infección por el tipo de virus de papiloma humano del cual se origina la secuencia.

20 De manera conveniente el péptido L2 es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra cuando menos dos diferentes tipos de virus de papiloma humano. Los virus de papiloma humano se clasifican por tipo basándose en la similitud de ácido nucleico. En la literatura se han descrito numerosos tipos de virus de papiloma
25 humano. De este modo, en el contexto de la presente divulgación, un

péptido L2 es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra un tipo específico de virus de papiloma humano, por ejemplo, un tipo de virus de papiloma humano referenciado particular, tal como el HPV tipo 18 (o cualquier otro tipo de virus de papiloma humano referenciado). Además, el péptido L2, como se presente en el contexto del polipéptido quimérico L1/L2 descrito en la presente también es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra un tipo de virus de papiloma humano distinto del tipo de virus de papiloma humano referenciado. Para facilidad de referencia, el tipo de virus de papiloma humano distinto del tipo referenciado del tipo de virus de papiloma humano se refiere como el "tipo no HPV". Por ejemplo, cuando el tipo de virus de papiloma humano referenciado es HPV 18, cualquier otro tipo distinto de HPV 18 se puede referir como péptido no HPV tipo 18 (o polipéptido o virus). De manera similar, con respecto a cualquier tipo referenciado de virus de papiloma humano, cualquier otro tipo diferente del tipo HPV referenciado se puede referir como tipo no HPV.

Por ejemplo, el péptido L2 puede inducir una respuesta inmunitaria contra una o más proteínas L2 de diferentes tipos de virus de papiloma humano. En cualquier modalidad divulgada en la presente el péptido o péptidos HPV L2 pueden ser capaces de inducir reacción cruzada, neutralización cruzada y/o respuesta protectora cruzada contra otro tipo de virus de papiloma humano. De manera conveniente el péptido L2 se selecciona cuando muestra un alto nivel de identidad de secuencia entre ("homología") entre los

tipos de virus de papiloma humano que sea mayor del 80 por ciento entre dos (o más) tipos. En algunos casos, el péptido L2 tiene una identidad de secuencia mayor del 85 por ciento entre tipos, o mayor del 90 por ciento de identidad de secuencia entre tipos, o mayor del 95 por ciento de identidad de secuencia entre tipos. En ciertas modalidades, el péptido L2 se selecciona para que tenga el 100 por ciento de identidad de secuencia entre cuando menos dos tipos de virus de papiloma humano. Estos péptidos L2 se pueden referir en la presente como secuencias de "consenso" de L2.

10 Por ejemplo, en una modalidad particular, el péptido L2 es una secuencia de consenso que es idéntica (es decir, tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia) entre el virus de papiloma humano tipo 33 y el virus de papiloma humano tipo 11. Por ejemplo, en una modalidad ejemplar específica, la secuencia de consenso es idéntica
15 entre los aminoácidos 17-36 de L2. En otra modalidad, el péptido L2 es una secuencia de consenso que es idéntica entre HPV tipo 58 y HPV tipo 6. Por ejemplo, en una modalidad ejemplar específica, la secuencia de consenso es idéntica entre los aminoácidos 56-75 de HPV tipo 58 y HPV tipo 6.

20 Los péptidos L2 de reacción cruzada que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra otros tipos de virus de papiloma humano se pueden identificar de acuerdo con al presente divulgación. Como se muestra en la presente, las secuencias de L2 de diferentes tipos de virus de papiloma humano se pueden alinear
25 para identificar regiones con mucha similitud entre tipos de virus de

papiloma humano (véase la Figura 3 y otras secuencias mostradas en la presente). Están disponibles numerosos programas de secuencias para realizar estas alineaciones e identificar si hay una homología de secuencia. Esto puede permitir la selección de

5 péptidos L2 que son más semejantes entre los tipos de virus de papiloma humano de interés y por lo tanto potencialmente de reacción cruzada entre algunos o todos esos tipos de virus de papiloma humano.

Los péptidos L2 de la presente divulgación también pueden ser

10 péptidos L2 inmunogénicos convenientes. Los péptidos L2 se pueden examinar para determinar su inmunogenicidad y reactividad cruzada mediante técnicas estándares muy conocidas en el campo. Por ejemplo, los péptidos de polipéptidos L1 quiméricos, capsómeros o partículas parecidas a virus que contienen los péptidos se pueden

15 inyectar en modelos animales o humanos y medir los anticuerpos y/o las respuestas inmunes celulares que se pueden llevar a cabo por ejemplo mediante ELISA o análisis/medición de citoquina, respectivamente. Los métodos para buscar anticuerpos son muy conocidos en la técnica. Se puede usar un ELISA para valorar la

20 reactividad cruzada de los anticuerpos. Se pueden examinar los anticuerpos para ver sus propiedades de neutralización y neutralización cruzada usando un ensayo de neutralización de pseudovirus por ejemplo. Los ensayos de neutralización de pseudovirus convenientes se describen en Dessy y colaboradores

25 2008 y Pastrana y colaboradores 2004.

Además varios péptidos L2 de reacción cruzada han sido identificados. Por ejemplo un epítipo neutralizante común para HPV 6 y 16 se ha encontrado en la región de los aminoácidos (aa) 108-120 de HPV 16 L2 (Kawana y colaboradores 1998, 1999, 2001). En otro ejemplo, la inmunización de conejos con los péptidos L2 de HPV 16 de los aminoácidos (aa) 17-36, 56-75, 96-115 podría dar lugar a anticuerpos de neutralización cruzada (Kondo y colaboradores 2007, 2008). En otro ejemplo los aminoácidos (aa) 17-36 de L2 de HPV 16 se identificaron como un epítipo ampliamente de neutralización cruzada y protector después de la inmunización pasiva y estímulo en ratones BALB/c (Gambhira y colaboradores 2007). Se mostró una protección similar en ratones BALB/C por Alphs y colaboradores 2008 después de la vacunación con una vacuna de lipopéptido sintético que contenía los aminoácidos (aa) 17-36 de L2 a partir de HPV 16.

De manera conveniente el péptido o los péptidos L2 son péptidos de reacción cruzada, de manera que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce no sólo el L2 del genotipo de virus de papiloma humano a partir del cual se deriva el péptido L2, sino también una proteína L2 o péptido L2 de un genotipo de virus de papiloma humano distinto del cual este se deriva. Convenientemente el péptido tiene reacción cruzada con 1 ó 2 o más otros genotipos, convenientemente un genotipo asociado con el causante de cáncer cervical tal como el virus de papiloma humano tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ó 73 o

verrugas genitales tales como el HPV 6 u 11, o cáncer de la piel tales como el HPV 5, 8 ó 38.

En una modalidad, uno o más de los péptidos L2 se selecciona de un HPV tipo 16 o una versión modificada del mismo, y tiene
5 reacción cruzada contra cuando menos otro cáncer que causa el tipo de virus de papiloma humano, tal como el tipo seleccionado de HPV 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ó 73 y/o cuando menos un tipo de virus de papiloma humano causante de verrugas genitales tales como el HPV 6 u 11 y/o cuando menos un tipo de
10 virus de papiloma humano causante de cáncer de piel tal como el HPV 5, 8 ó 38. En otra modalidad, uno o más péptidos L2 se seleccionan del virus de papiloma humano tipo 18 o una versión modificada del mismo.

Convenientemente los péptidos L2 usados en la invención son
15 capaces de generar una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada, esto es una respuesta inmunitaria que es capaz de neutralizar el virus de papiloma humano de un tipo diferente de virus de papiloma humano que el tipo de virus de papiloma humano a partir del cual se deriva el péptido L2. Se pueden examinar la neutralización cruzada
20 mediante ensayos conocidos en el campo como el ensayo de pseudoneutralización descrito en la presente en el Ejemplo 3.

Convenientemente, el péptido L2 es capaz de proporcionar protección cruzada, y convenientemente proporciona un epítipo de neutralización cruzada, conveniente para uno o más de los tipos de
25 virus de papiloma humano asociados con el cáncer cervical

seleccionado de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ó 73 y/o cuando menos un tipo de virus de papiloma humano causante de verrugas genitales tales como HPV 6 u 11 y/o cuando menos un tipo de virus de papiloma humano causante de cáncer de piel tales como el HPV 5, 8 ó 38.

La protección cruzada convenientemente ocurre cuando un péptido L2 es capaz de generar una respuesta inmunitaria protectora contra la infección/enfermedad causada por cuando menos dos tipos de virus de papiloma humano. Por ejemplo, cuando se presenta en el contexto de un polipéptido quimérico L1/L2, el L2 puede inducir una respuesta que protege contra el tipo a partir del cual se obtiene el péptido L2, y cuando menos un tipo adicional de virus de papiloma humano. Como se señaló anteriormente, la protección cruzada también se puede presentar cuando se selecciona un péptido L2 de consenso y se presenta en el contexto de un polipéptido quimérico L1/L2. La protección cruzada contra diferentes tipos de virus de papiloma humano diferentes al péptido L2 o a la partícula parecida a virus L1 de la cual se deriva, se pueden identificar usando un modelo animal, por ejemplo un modelo de ratón como se describe en Alphs y colaboradores 2008.

La protección cruzada se puede valorar comparando la incidencia de infección y/o enfermedad a partir de un grupo de tipos de virus de papiloma humano (siendo la infección incidente o infección persistente) en individuos vacunados con un péptido L2 dado comparado con un grupo no vacunado. La protección cruzada

completa contra un tipo, o grupo de tipos, no se requiere de acuerdo con la presente divulgación; sin embargo, cualquier nivel de protección cruzada proporciona un beneficio. Convenientemente el nivel de protección cruzada observada es tal que el grupo vacunado
5 tiene 5 por ciento menos infección y/o enfermedad asociada con un tipo o tipos de virus de papiloma humano no vacuna, que un grupo no vacunado, más convenientemente hasta el 10 por ciento, hasta el 15 por ciento, hasta el 20 por ciento, hasta el 25 por ciento, hasta el 30 por ciento, hasta el 35 por ciento, hasta el 40 por ciento, hasta el
10 45 por ciento, hasta el 50 por ciento, hasta el 55 por ciento, hasta el 60 por ciento, hasta el 65 por ciento, hasta el 70 por ciento, hasta el 80 por ciento, hasta el 90 por ciento, o aún hasta el 100 por ciento menos infección y/o enfermedad.

La protección cruzada se puede estimar detectando la
15 presencia de ácido nucleico específico para varios tipos de virus de papiloma humano en las vacunas y el grupo de control. La detección se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando técnicas como se describe en el WO 03/014402 (US2007031828A1), y las referencias en las mismas, particularmente para la amplificación no específica
20 del ADN de virus de papiloma humano y la detección posterior de tipos de ADN usando el sistema LiPA como se describe en WO 99/14377 (US6482588B1), y en Kleter y colaboradores (Journal of Clinical Microbiology (1999), 37 (8): 2508-2517), el contenido entero de los cuales se incorpora en la presente mediante referencia.
25 Cualquier método conveniente, sin embargo, se puede usar para la

detección del ADN del virus de papiloma humano en una muestra, tal como PCR específica al tipo usando cebadores específicos para cada tipo de virus de papiloma humano de interés. Los cebadores convenientes son conocidos para los expertos, o se pueden construir
 5 fácilmente dado que las secuencias de diferentes tipos de virus de papiloma humano se conocen.

Convenientemente la protección cruzada se observa en la población de macho y/o hembra, convenientemente en mujeres que son seronegativas para la infección del virus de papiloma humano, o
 10 seronegativas para HPV 16 y 18, adecuadamente en adolescentes mujeres con actividad presexual.

La protección cruzada (estimada por la protección vista en el grupo vacunado contra un grupo de control) se ve convenientemente contra tipos oncogénicos, tales como cualquiera del grupo de tipos
 15 de cáncer de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ó 73 o, colectivamente, grupos de tipos de cáncer de alto riesgo tales como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o sin duda todos, de estos tipos de cáncer de alto riesgo. Todas las combinaciones posibles de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y
 20 14 de estos tipos de cáncer de alto riesgo se contemplan específicamente.

ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN A LOS POLIPÉPTIDOS L1/L2

Otra característica de esta divulgación es las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos
 25 quiméricos L1/L2 antes mencionados.

Estos ácidos nucleicos pueden ser ácidos nucleicos "recombinantes", los cuales tienen una secuencia que no se presenta naturalmente o tiene una secuencia que está hecha mediante una combinación artificial de dos segmentos de otro modo separados de la secuencia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos quiméricos recombinantes L1/L2 incluyen cuando menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido HPV L2 operablemente enlazado a cuando menos uno (y fase móvil cuando menos dos) segmentos de ácido nucleico que codifican un polipéptido HPV L1 (o fragmentos del mismo). Esta combinación artificial se puede llevar a cabo mediante síntesis única o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Por consistencia, una proteína "recombinante" es una que está codificada por un ácido nucleico recombinante, (y el cual se puede introducir en una célula huésped, tal como una célula bacteriana o eucariótica).

En ciertas modalidades, los ácidos nucleicos recombinantes que codifican a los polipéptidos quiméricos L1/L2 se optimizan en codones para la expresión en una célula huésped seleccionada procariótica o eucariótica.

Para facilitar la réplica y la expresión, los ácidos nucleicos que codifican a los polipéptidos quiméricos L1/L2 se pueden incorporar en un vector, tal como un vector de expresión procariótico o eucariótico. Las células huésped que incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido quimérico L1/L2 también son una

característica de esta divulgación. Las células huésped favorables incluyen células huéspedes procarióticas (es decir, bacterianas) tales como *E. coli*, así como numerosas células huéspedes eucarióticas, incluyendo células de hongos (por ejemplo, levadura),
5 células de insectos, y células de mamíferos (tales como CHO, VERO y células HEK293).

Para facilitar la réplica y la expresión, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector, tal como un vector de expresión procariótico o eucariótico. Aunque los ácidos nucleicos descritos en
10 la presente se pueden incluir en cualquiera de una variedad de vectores (incluyendo, por ejemplo, los plásmidos bacterianos; ADN fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fago, ADN viral tal como vacuna, adenovirus, virus de viruela aviaria, pseudo rabia, adenovirus, virus
15 adeno asociados, retrovirus y muchos otros), más comúnmente el vector será un vector de expresión conveniente para generar productos de expresión del polipéptido. En un vector de expresión, el ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico L1/L2 típicamente se arregla en proximidad y orientación a una secuencia
20 de control de transcripción apropiada (promotor, y opcionalmente, uno o más mejoradores) para dirigir la síntesis del ARNm. Esto es, la secuencia de polinucleótidos de interés se enlaza operablemente a una secuencia de control de transcripción apropiada. Los ejemplos de estos promotores incluyen: el promotor temprano inmediato de
25 CMV, LTR o el promotor SV40, el promotor de polihedrina de

5 baculovirus, el promotor lac o trp de *E. coli*, el promotor del fago T7 y lambda P_L, y otros promotores conocidos para controlar la expresión de los genes en células procarióticas o eucarióticas de sus virus. El vector de expresión típicamente también contiene un sitio de enlace de ribosoma para la iniciación de la traducción, y el terminador de la transcripción. El vector opcionalmente incluye secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión opcionalmente comprende uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células huéspedes transformadas, tales como el dihidrofolato reductasa o la resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o tales como resistencia a la canamicina, tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

15 El vector de expresión también puede incluir elementos de expresión adicionales, por ejemplo, para mejorar la eficiencia de la traducción. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, un codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En algunos casos, por ejemplo, un codón de iniciación de la traducción y elementos de secuencia asociados se insertan en el vector de expresión apropiado simultáneamente con la secuencia de polinucleótidos de interés (por ejemplo, un codón inicial natural). En estos casos, no se requieren señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en casos en donde solamente una secuencia que codifica un polipéptido, o una porción del mismo, se inserta, las señales de control de traducción exógenas, incluyendo un codón de iniciación

25

ATG se proporciona para la traducción del ácido nucleico que codifica al polipéptido quimérico L1/L2. El codón de iniciación se coloca en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la secuencia de polinucleótidos de interés. Los elementos de transcripción exógenos y los codones de iniciación pueden tener
5 varios orígenes, tanto natural como sintéticos. Si se desea, la eficiencia de la expresión se puede aumentar más mediante la inclusión de mejoradores apropiados para el sistema celular en uso (Scharf y colaboradores (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; Bitter y colaboradores (1987) Methods in Enzymol 153:516-544).
10

En algunos casos, el ácido nucleico (tal como un vector) que codifica al polipéptido quimérico L1/L2 incluye uno o más elementos de secuencia adicionales seleccionados para aumentar y/o optimizar la expresión del polipéptido codificado cuando se introduce en una
15 célula huésped. Por ejemplo, en ciertas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican al polipéptido quimérico L1/L2 incluyen una secuencia de intrones, tal como una secuencia de intrones humana de virus herpes 5 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 13). Los intrones se ha demostrado en repetidas ocasiones que aumentan la expresión
20 de los ácidos nucleicos homólogos y heterólogos cuando se colocan apropiadamente en una construcción recombinante.

Los procedimientos ejemplares suficientes para guiar a una persona con experiencia en la técnica a través de la producción de ácidos nucleicos recombinantes que codifican polipéptidos
25 quiméricos L1/L2 se pueden encontrar en Sambrook y colaboradores,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a Edición, Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos a 2003); y Ausubel y colaboradores, *Short Protocols in Molecular Biology: A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4a Edición, Wiley and Sons, 1999.

Las secuencias de ácido nucleico de ejemplo que codifican los polipéptidos HPV L1 y L2 de los diferentes tipos de virus de papiloma humano son muy conocidos en el campo, por ejemplo, se han descrito numerosos ejemplos en la literatura y están disponibles públicamente en la base de datos de GenBank. Esto se puede identificar fácilmente por los expertos en la técnica mediante una investigación apropiada usando los términos virus de papiloma humano (o HPV) y la proteína específica (por ejemplo, L1 o L2) y el tipo de interés. Estos ácidos nucleicos L1 y L2 se pueden utilizar para producir ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos quiméricos L1/L2 recombinantes como se describen anteriormente.

Los ácidos nucleicos adicionales que codifican variantes nucleicos quiméricos del L1/L2 que comparten identidad de secuencia con el polipéptido L1 y L2 de ejemplo se pueden producir por los expertos en la técnica. Típicamente, las variantes de ácidos nucleicos codificarán polipéptidos que difieren por no más del 1 por ciento, o del 2 por ciento, o del 5 por ciento, o del 10 por ciento, o

del 15 por ciento, o del 20 por ciento de los residuos de aminoácidos presentes en un polipéptido quimérico L1/L2 (por ejemplo, en la porción del polipéptido L1). Esto es, los polipéptidos codificados comparten cuando menos el 80 por ciento, o el 85 por ciento, más
5 comúnmente, cuando menos aproximadamente el 90 por ciento o más, tal como el 95 por ciento, o hasta el 98 por ciento o 99 por ciento de identidad de secuencia con el polipéptido quimérico de referencia. Los expertos en la técnica entenderán inmediatamente, que las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptido
10 quiméricos L1/L2, pueden ellos mismos compartir menos identidad de secuencia debido a la redundancia del código genético. En algunos casos, el polipéptido L1/L2 codificado tiene una o más notificaciones de aminoácidos relativas a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos que se presentan naturalmente a partir de los cuales se
15 deriva. Estas diferencias pueden dar como resultado la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos. Una variante típicamente difiere por no más de aproximadamente el 1 por ciento, o el 2 por ciento, o el 5 por ciento, o el 10 por ciento, o el 15 por ciento, o el 20 por ciento de los residuos de nucleótidos. Por
20 ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico L1/L2 puede incluir 1, o 2, o hasta 5, o hasta aproximadamente 10, o hasta aproximadamente 15, o hasta aproximadamente 50, o hasta aproximadamente 100 diferencias de nucleótidos (por ejemplo, en la porción L1, y/o para codificar los péptidos L2 modificados como se
25 describió anteriormente). De este modo, una variante en el contexto

de un ácido nucleico que codifica un polipéptido L1/L2 quimérico como se describe en la presente, típicamente comparte cuando menos el 80 por ciento, o el 85 por ciento, más comúnmente, cuando menos aproximadamente el 90 por ciento o más, tal como el 95 por
5 ciento, o hasta el 98 por ciento o 99 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia de referencia que consiste en los componentes L1 y L2 que se presentan naturalmente.

Además de los ácidos nucleicos variantes previamente descritos, los ácidos nucleicos que hibridan a uno o más ácidos
10 nucleicos que codifican los polipéptidos quiméricos L1/L2 con las secuencias L1 y L2 correspondientes a los polipéptidos L1 y L2 que se presentan naturalmente también se usan para codificar a los polipéptidos quiméricos L1/L2. Un experto en la técnica apreciará que además de la medición del porcentaje de identidad de secuencia
15 discutida anteriormente, otros indicadores de la similitud de secuencia entre dos ácidos nucleicos es la capacidad de hibridar. Entre más semejantes sean las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más estrictas las condiciones en las cuales se hibridarán. La rigurosidad de las condiciones de hibridación depende de la
20 secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. De este modo, las condiciones de hibridación dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación que se elija y la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos de hibridación. En
25 general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica

(especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) del regulador de hibridación determinará la rigurosidad de hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen la rigurosidad. En general, las condiciones estrictas se seleccionan que sean aproximadamente 5°C a 20°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida y pH definido. La T_m es la temperatura (bajo la fuerza iónica definida y el pH) a la cual el 50 por ciento de la secuencia objetivo hibrida a una sonda perfectamente acoplada. Las condiciones de la hibridación de ácido nucleico y el cálculo de las rigurosidades se puede encontrar, por ejemplo, en Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes, parte 1: Theory and Nucleic Acid Preparation*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993, y Ausubel y colaboradores *Short Protocols in Molecular Biology*, 4a Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Para los propósitos de la presente divulgación, "condiciones estrictas o rigurosas" abarca las condiciones bajo las cuales la hibridación ocurrirá solamente si hay menos del 25 por ciento de falta de coincidencia entre la molécula de hibridación y la secuencia objetivo. "Condiciones estrictas" se pueden descomponer en niveles particulares de rigurosidad para la definición más precisa. De este modo, como se usa en la presente, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas bajo las cuales las moléculas con más del

25 por ciento de falta de coincidencia de secuencia no se hibridan; las condiciones de "rigurosidad media" son aquellas en las cuales las moléculas con más del 15 por ciento de falta de coincidencia no se hibridan, y las condiciones de "alta rigurosidad" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más del 10 por ciento de falta de coincidencia no se hibridan. Las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas en las cuales las secuencias con más del 6 por ciento de falta de coincidencia no se hibridan. En cambio, los ácidos nucleicos que se hibridan bajo "condiciones de baja rigurosidad" incluyen aquellos con mucho menos identidad de secuencia, o con identidad de secuencia sobre solamente subsecuencias cortas del ácido nucleico.

MÉTODOS PARA PRODUCIR LOS POLIPÉPTIDOS L1/L2

Los polipéptidos quiméricos L1/L2 descritos en la presente se pueden producir usando procedimientos bien establecidos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Los procedimientos suficientes para guiar a un experto se pueden encontrar en las siguientes referencias: Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; y Ausubel y colaboradores *Short Protocols in Molecular Biology*, 4a Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999. Los detalles adicionales y específicos se proporcionan más adelante en la presente.

Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican los polipéptidos quiméricos L1/L2 se introducen en las células

huéspedes por cualquier variedad de procedimientos bien conocidos, tales como la electroincorporación, la transfección mediada por liposoma (por ejemplo, usando un reactivo de transfección liposomal disponible comercialmente, tal como LIPOFECTAMINE™ 2000 o 5 TRANSFECTIN™), precipitación con fosfato de calcio, infección, transfección y similares, dependiendo de la selección de vectores y células huéspedes.

Las células huéspedes que incluyen los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos quiméricos L1/L2 son, de este modo, 10 también una característica de esta divulgación. Las células huéspedes favorables incluyen las células huéspedes procarióticas (es decir, bacterianas) tales como *E. coli*, así como numerosas células huéspedes eucarióticas, incluyendo hongos (por ejemplo, levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Picchia pastoris*), 15 células de insectos, células vegetales, y células de mamíferos (tales como CHO y células HEK293). Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican los polipéptidos quiméricos L1/L2 se introducen (por ejemplo, traducen, transforman o transfectan) en las células huéspedes, por ejemplo, vía un vector, tal como un vector de 20 expresión. Como se describió anteriormente, el vector puede ser un plásmido, una partícula viral, un fago, un baculovirus, etc. Ejemplos de huéspedes de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células de hongos, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Picchia pastoris*, y 25 *Neurospora crassa*; células de insecto tales como *Trichoplusia*,

Drosophila, *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero tales como 3T3, COS, CHO, BHK, HEK 293 o melanoma de Bowes; células vegetales, incluyendo células de algas, etc.

Las células huéspedes se pueden cultivar en medio nutriente
 5 convencional modificado como sea apropiado para activar
 promotores, seleccionar transformantes, o amplificar las secuencias
 de polinucleótidos insertadas. Las condiciones del cultivo, tales
 como la temperatura, el pH y similares, son típicamente los
 previamente usados con la célula huésped seleccionada para la
 10 expresión, y serán aparentes para los expertos en la técnica y en las
 referencias citadas en la presente, incluyendo, por ejemplo,
 Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic
 Technique*, tercera edición, Wiley- Liss, Nueva York y las referencias
 citadas en la misma. Los productos de la expresión correspondientes
 15 a los ácidos nucleicos de la invención también se pueden producir en
 células no animales tales como vegetales, levaduras, hongos,
 bacterias y similares. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, los
 detalles con respecto al cultivo celular se pueden encontrar en
 Payne y colaboradores (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid
 20 Systems* John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamborg and
 Phillips (Editores) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture;
 Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlín
 Heidelberg, Nueva York) y Atlas y Parks (Editores) *The Handbook of
 Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

25 En los sistemas bacterianos, varios vectores de expresión se

pueden seleccionar dependiendo del uso pretendido del producto expresado. Por ejemplo, cuando grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo son necesarias para la producción de anticuerpos, los vectores que dirigen alto nivel de expresión de polipéptidos quiméricos L1/L2 que son fácilmente purificados se emplean favorablemente. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de clonación y expresión multifuncional de *E. coli* tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en el cual la secuencia de codificación de interés, por ejemplo, un polinucleótido de la invención como se describe anteriormente, se puede ligar en el vector en cuadro con las secuencias para la producción en el extremo amino iniciando metionina y los 7 residuos posteriores de beta-galactosidasa produciendo una proteína de fusión beta galactosidasa catalíticamente activa; los vectores pLN (Van Heeke & Schuster (1989) *J Biol Chem* 264: 5503-5509); los vectores pET (Novagen, Madison WI), en las cuales la metionina en el extremo amino se liga en cuadro con una etiqueta histidina; y similares.

De igual manera, en las levaduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH para la producción de productos de expresión deseados. Para revisiones, véase Berger, Ausubel, y, por ejemplo, Grant y colaboradores (1987; *Methods in Enzymology* 153: 516-544). En las células huéspedes de mamíferos, se pueden usar varios sistemas de

expresión, incluyendo tanto sistemas basados en plasmas como virales.

Una célula huésped opcionalmente se elige por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para
5 procesar la proteína expresada de la manera deseada. Estas modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, (así como, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, lipidación y acilación). Diferentes células huéspedes tales como 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, 293, WI38, etc.,
10 tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para estas actividades post-traducción y se pueden elegir para asegurar la correcta modificación y el procesamiento de la proteína extraña introducida.

En ciertos ejemplos, los ácidos nucleicos se introducen en
15 células vía vectores convenientes para la introducción y la expresión en células procarióticas, por ejemplo, células de *E. coli*. El vector de expresión se introduce (por ejemplo, mediante electroincorporación) en una huésped bacteriana conveniente. Numerosas cepas adecuadas de *E. coli* están disponibles y se pueden seleccionar por
20 un experto (por ejemplo, las cepas Rosetta y BL21 (DE3) han demostrado ser favorables para la expresión de vectores recombinantes que contienen secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido quimérico L1/L2.

Más típicamente, los polinucleótidos que codifican el
25 polipéptido quimérico L1/L2 se incorporan en los vectores de

expresión que son convenientes para la introducción y la expresión en células eucarióticas (por ejemplo, células de insectos o de mamíferos). De manera favorable, estos ácidos nucleicos son codones optimizados para la expresión en la célula huésped/el vector

5 seleccionado.

En un ejemplo, la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido quimérico L1/L2 se introduce en células de insecto usando un Sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS). El baculovirus recombinante capaz de infectar células de insectos se

10 puede generar usando vectores comercialmente disponibles, y/o sistemas, tales como el sistema BD BaculoGold de BD BioScience. En pocas palabras, una secuencia de polinucleótidos que codifique el polipéptido quimérico L1/L2 se inserta en el vector de transferencia pAcSG2. Luego, las células huéspedes SF9 (*Spodoptera frugiperda*)

15 se cotransfecta mediante el plásmido quimérico pAcSG2 y BD BaculoGold, que contienen el ADN genómico linealizado del baculovirus de virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV). Después de la transfección, la recombinación homóloga ocurre entre el plásmido pACSG2 y el genoma de Baculovirus para

20 generar el virus recombinante. En un ejemplo, el antígeno de polipéptido quimérico L1/L2 se expresa bajo el control regulador del promotor de polihedrina (pH). Se pueden producir vectores de transferencia similares usando otros promotores, tales como los promotores básicos (Ba) y p10. De manera similar, se pueden

25 emplear células de insectos alternativas, tales como SF21 que está

cercanamente relacionada al Sf9, y la línea celular High Five derivada de un gusano de repollo o col, *Trichoplusia ni*.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de polipéptidos quiméricos L1/L2 descritos en la presente, típicamente se usa sistemas de expresión estables. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente un polipéptido quimérico L1/L2 se introducen en la célula huésped usando vectores de expresión que contienen orígenes virales de réplica o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se deja que las células crezcan durante 1 ó 2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresen con éxito las secuencias introducidas. Por ejemplo, grupos resistentes o colonias de células transformadas establemente pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas al tipo de célula. Las células huéspedes transformadas con ácido nucleico codifican un polipéptido quimérico L1/L2 se cultivan opcionalmente bajo condiciones adecuadas para la expresión y la recuperación de la proteína codificada a partir del cultivo celular.

Después de la traducción de una línea celular huésped conveniente y el crecimiento de las células huéspedes a una densidad celular apropiada, se induce el promotor seleccionado mediante medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o

inducción química) y se cultivan las células durante un período adicional.

El producto del polipéptido secretado se recupera entonces y/o se purifica a partir del medio de cultivo. El término "purificación" (por ejemplo, con respecto a un polipéptido quimérico L1/L2, o ácido nucleico que codifica a un polipéptido así) se refiere al proceso de remover componentes de una composición, cuya presencia no se desea. La purificación es un término relativo, y no requiere que todas las trazas de un componente no deseable se remuevan de la composición. En el contexto de producción de proteínas, la purificación incluye procesos como la centrifugación, dialización, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía de exclusión de tamaño, purificación por afinidad o precipitación. El término "purificado" no requiere pureza absoluta; en vez de eso, se pretende que sea un término relativo. De este modo, por ejemplo, una preparación de polipéptido purificado (o capsómero, o VLP) es una en la cual el polipéptido está más enriquecido que en su ambiente generador, por ejemplo dentro de una célula o población de células en las cuales se replica de manera natural o en un ambiente artificial. Una preparación de polipéptidos quiméricos L1/L2 sustancialmente puros se puede purificar de manera que los polipéptidos quiméricos deseados representen cuando menos el 50 por ciento del contenido de proteína total de la preparación. En ciertas modalidades, un polipéptido quimérico L1/L2 representará cuando menos el 60 por ciento, cuando menos el 70 por ciento,

cuando menos el 80 por ciento, cuando menos el 85 por ciento, cuando menos el 90 por ciento, o cuando menos el 95 por ciento o más del contenido de proteína total de la preparación

En la producción y purificación de un polipéptido quimérico L1/L2, las células se pueden cosechar mediante centrifugación, separar por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante retenerse para purificación adicional. Las células eucarióticas o microbianas empleadas en la expresión de proteínas se puede separar por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación, zonificación, separación mecánica, o uso de agentes que lisan las células, u otros métodos, que son muy conocidos para los expertos en el campo.

Los polipéptidos quiméricos L1/L2 expresados se pueden entonces recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes mediante cualquier número de métodos muy conocidos en la técnica, incluyendo precipitación en sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, filtración, ultrafiltración, centrifugación, cromatografía por intercambio de aniones o cationes, cromatografía fosfocelulosa, cromatografía por interacción hidrofóbica, cromatografía por afinidad (por ejemplo, usando cualquiera de los sistemas marcadores anotados en la presente), cromatografía hidroxipatita, y cromatografía de lectina. Se pueden usar pasos de replegamiento de proteína, como se desee, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

en los pasos de purificación finales. Además de las referencias anotadas anteriormente, una variedad de métodos de purificación son muy conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los presentados en Sandana (1997) *Gioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; y Bolla y colaboradores (1996) *Protein Methods*, 2a Edición, Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.; Scopes (1993) *Protein Purification principles and Practice*, 3a Edición, Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution methods and Applications*, Segunda Edición, Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Human Press, NJ. WO 2010/012780 (incorporada en la presente mediante referencia) describe un proceso para purificar HPV 16 y HPV 18 VLP. Un proceso análogo se puede aplicar a la purificación de los polipéptidos quiméricos descritos en la presente. De este modo los polipéptidos quiméricos se pueden extraer de las células huéspedes en un regulador reductor β -mercaptoetanol (BME) y luego someterse a cromatografía de aniones e hidroxipatita y luego dejando que el producto resultante madure, mediante la remoción del BME. El producto resultante se puede volver estéril, mediante filtración estéril.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y MÉTODOS

Otro aspecto de la presente divulgación concierne a las composiciones inmunogénicas que contienen polipéptidos quiméricos

L1/L2 (o capsómeros o VLP conformada por los polipéptidos quiméricos L1/L2). Estas composiciones inmunogénicas pueden incluir los polipéptidos quiméricos L1/L2 solos o en combinación, por ejemplo, con polipéptidos quiméricos L1/L2 adicionales y/o con
5 partículas parecidas a virus (por ejemplo, L1 VLP).

En ciertas modalidades, cualquiera de los polipéptidos quiméricos L1/L2 descritos en la presente anteriormente es un componente de una composición inmunogénica. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir un polipéptido quimérico
10 L1/L2 que incluye un HPV tipo 18 polipéptido L1 o fragmento del mismo en el cual cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 se ha insertado (por ejemplo, un péptido L2 no HPV tipo 18). De manera similar, la composición inmunogénica puede incluir un polipéptido quimérico L1/L2 que
15 incluye un polipéptido L1 HPV tipo 16 o fragmento del mismo en el cual cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 se ha insertado (por ejemplo, un péptido L2 no HPV tipo 16). En ejemplos específicos, el péptido L2 insertado en el polipéptido L1 HPV 16 incluye (por ejemplo, consiste de) los
20 aminoácidos 56-75 (como se designa con respecto a la alineación con el HPV 16 L2) del polipéptido L2. Polipéptidos L1/L2 quiméricos convenientes adicionales para su uso en composiciones inmunogénicas incluyen cualquiera de las descritas anteriormente.

En ciertas modalidades, los polipéptidos quiméricos L1/L2
25 están presentes en composiciones inmunogénicas en combinación

con partículas parecidas a virus de virus de papiloma humano. Por ejemplo, en una modalidad, la composición inmunogénica incluye:

(i) cuando menos una partícula parecida a virus (VLP) que comprende un polipéptido L1 del virus de papiloma humano (HPV) o

5 fragmento del mismo; y

(ii) cuando menos un polipéptido quimérico que comprende un virus de papiloma humano (HPV) L1 o fragmento del mismo que comprende cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1.

10 En una modalidad el polipéptido quimérico es un polipéptido como se describe en la presente.

En una modalidad favorecida cuando menos una partícula parecida a virus comprende un polipéptido HPV 16 VLP L1 o fragmento del mismo. En otra modalidad cuando menos una partícula
15 parecida a virus comprende un polipéptido HPV 18 L1 o fragmento del mismo. De manera favorable en estas composiciones el polipéptido quimérico se ensambla en un ensamble supramolecular tal como capsómeros o partículas parecidas a virus o estructuras pequeñas no parecidas a virus.

20 En una modalidad la composición comprende (i) cuando menos un HPV L1 VLP; y (ii) dos polipéptidos quiméricos HPV L1 VLP, o capsómeros, cada uno comprendiendo un péptido L2 en la secuencia de L1. En una modalidad favorecida los dos polipéptidos quiméricos L1 (o capsómeros o VLP) pueden comprender diferentes péptidos L2
25 en los polipéptidos L1 a partir del mismo tipo de virus de papiloma

humano (por ejemplo HPV 16 o HPV 18). De manera alternativa, los dos polipéptidos quiméricos L1, capsómeros o VLP pueden comprender el mismo péptido L2 en el polipéptido L1 a partir de dos diferentes tipos de virus de papiloma humano tales como el HPV 16 y HPV 18. En todavía otra modalidad, los dos polipéptidos quiméricos L1 o capsómeros o VLP, pueden comprender diferentes péptidos L2 en polipéptidos L1 a partir de dos diferentes tipos de virus de papiloma humano (tales como HPV 16 y HPV 18 y/o HPV 33 y HPV 58). En modalidades específicas, los péptidos L2 pueden ser de HPV 33 o HPV 58, y se pueden insertar en HPV 18 L1. En estas modalidades, los diferentes péptidos L2 se pueden insertar de manera única en dos diferentes polipéptidos L1 de HPV tipo 18, o se pueden insertar en el mismo o diferentes sitios en el mismo polipéptido L1 de HPV tipo 18.

En ciertas modalidades, las partículas parecidas a virus de virus de papiloma humano (particularmente el HPV L1 solamente partículas parecidas a virus) y partículas parecidas a virus quiméricas, polipéptidos o capsómeros, incluidos en las composiciones de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir uno o más de los HPV 6 VLP, HPV 11 VLP, HPV 16 VLP y HPV 18 L1 VLP. Por ejemplo pueden incluir partículas parecidas a virus de HPV 16 y 18, o HPV 6 y 11, o de los 4 tipos de virus de papiloma humano. Convenientemente las partículas parecidas a virus HPV L1 y los polipéptidos L1 de virus de papiloma humano quiméricos, son de HPV 16 y/o HPV 18.

Los HPV VLP para su uso como se describe en la presente, ya sea quimérico o no quimérico, se pueden ensamblar a partir de L2 también, o pueden ser solamente partículas parecidas a virus L1. Por ejemplo, las partículas parecidas a virus se pueden ensamblar de una mezcla de polipéptidos L1 y L2 (y como tal no es lo mismo que las partículas parecidas a virus quiméricas L1/L2 divulgadas en la presente, en los cuales un péptido L2 se inserta en la secuencia de L1). De manera alternativa, las partículas parecidas a virus pueden ser partículas parecidas a virus quiméricas distintas del polipéptido L1/L2 divulgado en la presente. Por ejemplo, estos polipéptidos no L1/L2 pueden incluir un polipéptido L1 y cuando menos una secuencia adicional de un polipéptido de virus de papiloma humano distinto de L1, tal como E7.

El HPV L1 en las partículas parecidas a virus o a partir de los polipéptidos quiméricos divulgados en la presente se pueden formar ya sea de la proteína HPV L1 de longitud completa o ciertos derivados de L1, tales como fragmentos, usando los métodos estándares en la técnica, por ejemplo como se describe en la WO 03/077942 (US7416846) o en la WO 99/13056 (US7351533) incorporadas en la presente mediante referencia.

En una modalidad particular de la composición divulgada en la presente, las HPV L1 VLP comprenden o consisten en partículas parecidas a virus de HPV 16 y HPV 18, y las HPV L1 VLP comprenden o consisten en HPV 16 L1 VLP quiméricas o HPV 18 L1 VLP quiméricas o ambas. Cuando están presentes las partículas

parecidas a virus L1 tanto la HPV 16 como la HPV 18 quimérica, los péptidos L2 en cada uno pueden ser los mismos o diferentes y pueden ser cualquiera de los péptidos L2 divulgados en la presente.

Las composiciones inmunogénicas divulgadas en la presente típicamente incluyen cuando menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante. Una composición inmunogénica es una composición que provoca una respuesta inmunitaria cuando se administra a un animal o a un humano, en donde la respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria protectora la cual no necesariamente es completamente protectora contra la infección o la enfermedad pero cuando menos reduce la incidencia de la infección o de la enfermedad.

Un adyuvante para su uso como se describe en la presente puede comprender una sal de aluminio. También convenientes son adyuvantes que estimulan una respuesta tipo Th1 tal como el 3 des-O-acilado monofosforilo lípido A 83D MPL) o QS21. Convenientemente el adyuvante es una sal de aluminio, adecuadamente en combinación con 3D MPL, tal como hidróxido de aluminio y 3D MPL. Las composiciones de acuerdo con la presente divulgación que comprenden este adyuvante se pueden preparar como se describe por ejemplo en la WO 00/23105 incorporada en la presente mediante referencia.

Las HPV L1 VLP y las HPV L1 VLP quiméricas para su uso como se describe en la presente se pueden adsorber sobre adyuvantes que contienen aluminio. El adyuvante se puede añadir a

diferentes partículas parecidas a virus para pre-adsorberlas antes de mezclar las diferentes partículas parecidas a virus para formar el producto de vacuna final.

La composición inmunogénica también puede comprender
5 aluminio o un compuesto de aluminio como estabilizante, y la presente divulgación también se relaciona con una composición estabilizada en donde las partículas parecidas a virus son adsorbidas sobre una sal de aluminio. Convenientemente las partículas parecidas a virus son más estables en el tiempo después
10 de la adsorción sobre una sal de aluminio que en ausencia del aluminio.

Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente se pueden administrar como vacunas mediante cualquier variedad de rutas tales como oral, tópica, subcutánea, mucosa (típicamente
15 intravaginal), intravenosa, intramuscular, intranasal, sublingual, intradérmica y vía supositorio. Las administraciones intramuscular e intradérmica son las preferidas.

La dosificación de los polipéptidos, y/o capsómeros y/o partículas parecidas a virus y otras proteínas pueden variar con la
20 condición, el sexo, la edad y el peso del individuo, la ruta de administración y el virus de papiloma humano de la vacuna.

La dosis del polipéptido y/o las partículas parecidas a virus presentes en las composiciones descritas en la presente pueden variar con la condición, sexo, edad y peso del individuo, la ruta de
25 administración y el virus de papiloma humano de la vacuna. La

cantidad también se puede variar con el número de tipos de partículas parecidas a virus. Convenientemente la administración de una cantidad de partículas parecidas a virus conveniente para generar una respuesta protectora inmunológicamente. De una
 5 manera conveniente, cada dosis de vacuna comprende de 1 a 100 microgramos de cada partículas parecidas a virus, convenientemente cuando menos 5 microgramos, o cuando menos 10 microgramos, por ejemplo, entre 5 y 50 microgramos cada partículas parecidas a virus, más convenientemente de 10 a 50 microgramos de cada partículas
 10 parecidas a virus, tal como con 5 microgramos, 6 microgramos, 10 microgramos, 15 microgramos, 20 microgramos, 40 microgramos o 50 microgramos. En ciertas modalidades, cuando están presentes tanto las partículas parecidas a virus quiméricas como no quiméricas estas cantidades reflejan el total de las partículas parecidas a virus
 15 presentes para cada tipo de virus de papiloma humano es decir partículas parecidas a virus L1 quiméricas con péptidos L2 y partículas parecidas a virus L1 sin el péptido L2.

Por ejemplo una composición de acuerdo con la presente divulgación puede comprender, en una sola dosis:

- 20 30 microgramos de HPV 16 VLP
- 30 microgramos de HPV 18 VLP
- 10 microgramos de HPV 16 VLP quimérica con un péptido L2
- 10 microgramos de HPV 18 VLP quimérica con un péptido L2,
- en donde el péptido L2 en las partículas parecidas a virus de
- 25 HPV 16 quimérico y HPV 18 es la misma o diferente, y se pueden

seleccionar de L2 56-75 y L2 17-36 como se describe más adelante en la presente, a partir del mismo o diferentes tipos de virus de papiloma humano.

En otro ejemplo una composición de acuerdo con la presente divulgación puede comprender, en una sola dosis:

20 microgramos de HPV 16 VLP

20 microgramos de HPV 18 VLP

10-20 microgramos de HPV 18 VLP quimérica con un péptido L2

10 10-20 microgramos de HPV 16 VLP quimérica con un péptido L2,

en donde el péptido L2 en las partículas parecidas a virus de HPV 16 quimérico y HPV 18 es la misma o diferente, y se pueden seleccionar de L2 56-75 y L2 17-36 como se describe anteriormente en la presente, a partir del mismo o diferentes tipos de virus de papiloma humano.

Convenientemente las composiciones anteriores además comprenden un adyuvante, convenientemente una sal de aluminio, convenientemente hidróxido de aluminio, convenientemente en combinación con un adyuvante Th1 tal como 3D-MPL.

Las composiciones descritas en la presente convenientemente generan una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal contra 1, 2 o más genotipos de virus de papiloma humano, convenientemente cualquiera 1, 2 ó 3, 4, 5 o más seleccionado del grupo de virus de papiloma humano 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33, 35,

38, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 73. De manera favorable las composiciones pueden generar una respuesta inmunitaria contra uno o más virus de papiloma humano tipo 2, 3 y 73.

Las composiciones descritas en la presente convenientemente proporcionan protección contra la infección y/o la enfermedad de 1, 2 o más genotipos de virus de papiloma humano, convenientemente cualquiera de 1, 2 o más seleccionados de HPV 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 38, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 73. Convenientemente las composiciones proporcionan protección contra cuando menos el HPV 16 ó 18, y más convenientemente contra tanto el HPV 16 como el 18.

Convenientemente las composiciones descritas en la presente proporcionan protección contra el HPV 16 y 18 y cuando menos algún otro tipo del virus de papiloma humano seleccionado del tipo de virus de papiloma humano que causa cáncer, los tipos de virus de papiloma humano que causan verrugas genitales y los tipos de virus de papiloma humano que causan cáncer de piel. Convenientemente las composiciones proporcionan protección contra uno o más de los siguientes tipos de virus de papiloma humano además del HPV 16 y HPV 18: HPV 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 38, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 73.

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas descritas en la presente se pueden usar para tratar o prevenir la infección y/o la enfermedad por virus de papiloma humano. Por ejemplo, la composición inmunogénica se puede usar terapéuticamente para

reducir la carga viral y/o las infecciones que conducen al carcinoma cervical o las secuelas de CIN III. La presente divulgación de este modo se relaciona con el uso de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente en el tratamiento terapéutico de las enfermedades relacionadas con la infección por virus de papiloma humano y en la profilaxis de la infección o la enfermedad. Convenientemente, el uso de la vacuna de la presente divulgación está en la profilaxis de la infección y/o la enfermedad. El término "infección", como se usa en la presente convenientemente se relaciona con la infección incidente y/o la infección persistente. La infección se puede valorar mediante PCR, por ejemplo. El término "enfermedad" como se usa en la presente puede ser una citología anormal, ASCUS, CIN1, CIN2, CIN3 o cáncer cervical relacionado con infección por virus de papiloma humano. La enfermedad se puede valorar mediante, por ejemplo, el examen histológico o le análisis de marcadores biológicos tales como p16.

Opcionalmente la composición inmunogénica o vacuna también se puede formular o coadministrar con otros antígenos de virus de papiloma humano tales como antígenos tempranos o antígenos no HPV. Convenientemente estos antígenos no HPV pueden proporcionar protección contra otras enfermedades, más convenientemente enfermedades sexualmente transmitidas tales como el virus de herpes simplex, clamidia y virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En una modalidad particular la vacuna comprende gD o un truncado del mismo del virus de herpes

símples (HSV). De esta manera la vacuna proporciona protección tanto contra HPV como para HSV.

Para todas las vacunas descritas en la presente, la vacuna se usa convenientemente para la vacunación de niños adolescentes entre 10 y 15 años de edad, convenientemente entre 10 y 13 años de edad. Convenientemente la vacuna también es conveniente para la administración a una población pediátrica, de 0 a 10 años de edad. La vacuna también se puede administrar a mujeres después de una prueba de Papanicolaou anormal o después de cirugía que sigue a la remoción de una lesión causada por el virus de papiloma humano. De este modo la vacuna se puede aplicar convenientemente tanto a una población seronegativa como una vacuna profiláctica y/o una población seropositiva en un escenario terapéutico. La vacuna también se puede administrar a varones.

Convenientemente la vacuna se administra en un régimen de 2 ó 3 dosis, por ejemplo en un régimen de 0, 1 o un régimen de 0, 2 o un régimen de 0,3 o un régimen de 0, 4 o un régimen de 0, 5 o un régimen de 0, 6 mes, o un régimen de 0,1 y 6 o un régimen de 0, 2 6 mes, respectivamente. Convenientemente el régimen de vacunación incorpora una inyección de refuerzo después de 5 a 10 años, convenientemente 10 años. Otros regímenes, con 4 o más dosis, también se pueden usar.

Convenientemente la vacuna es una formulación de vacuna líquida, aunque la vacuna se puede liofilizar y reconstituir antes de la administración.

5

10

15

20

Quimera #	Estructura L1	Posición de aminoácido L1 del péptido L2	Péptido L2 insertado	Mostrado en (SEQ ID NO)
#4-L1-HPV16/L2 ^{CI56-76}	HPV16	431-432	56-75 HPV58	(39)
#5-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36}	HPV16	137-138	17-36 HPV33	40
#7-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36- CI56-75}	HPV16	137-138 431-432	17-36 HPV33 y 56-75 HPV58	(42)
#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36}	HPV18	137-138	17-36 HPV33	(43)
#9-L1-HPV18/L2 ^{CI17-36}	HPV18	432-433	17-36 HPV33	(44)
#10-L1-HPV16/L2 ^{DE56-75}	HPV16	137-138	56-75 HPV58	(45)
L1-HPV16	HPV16			Fig. 1a
L1-HPV18	HPV18			Fig. 1b

Quimera 1: Polipéptido quimérico HPV 18 L1 HPV 58 L2 DE, en donde el péptido L2 GGLGIGTGSGTGGRTGYVPL (HPV 58/HPV 6) se inserta entre la posición 137 y la 138 en un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 18.

25 Quimera 2: Polipéptido quimérico HPV 18 L1 HPV 58 L2 CT, en

donde el péptido L2 GGLGIGTGSGTGGRGYVPL (HPV 58/HPV 6) se inserta entre la posición 432 - 433 en un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 18.

Quimera 3: Polipéptido quimérico HPV 18 L1 HPV 33 L2 y HPV 58 L2, en donde el péptido L2 QLYQTCKATGTCPDVIPKV (HPV 33/HPV 11) se inserta entre la posición 137 y la 138 el péptido L2 GGLGIGTGSGTGGRGYVPL (a partir de HPV 58 o HPV 6) se inserta en la posición 432 - 433 en un L1 truncado en el extremo C a partir del HPV 18.

Quimera 4: Polipéptido quimérico HPV 16 L1 HPV 58 L2 CT, en donde el péptido L2 GGLGIGTGSGTGGRGYVPL (HPV 58/HPV 6) se inserta entre la posición 431 y 432 en un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 16.

Quimera 5: Polipéptido quimérico HPV 16 L1 HPV 33 L2 CT, en donde el péptido L2 QLYQTCKATGTCPDVIPKV (HPV 33/HPV 11) se inserta entre la posición 137 y la 138 en un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 16.

Quimera 6: Polipéptido quimérico HPV 16 L1 HPV 33 L2 P/D, en donde el péptido L2 QLYQTCKATGTCPDVIPKV (HPV 33/HPV 11) se inserta entre la posición 272 y la 273 en un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 16.

Quimera 7: Polipéptido quimérico HPV 16 L1 HPV 33 L2 y HPV 58 L2, en donde el péptido L2 QLYQTCKATGTCPDVIPKV (HPV 33/HPV 11) se inserta entre la posición 137 y la 138 y el péptido L2 GGLGIGTGSGTGGRGYVPL se inserta en la posición 431 - 432 en

un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 16.

Quimera 8: Polipéptido quimérico HPV 18 L1 HPV 33 L2 DE, en donde el péptido L2 QLYQTCKATGTCPDVIPKV (HPV 33/HPV 11) se inserta entre la posición 137 y la 138 en un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 18.

Quimera 9: Polipéptido quimérico HPV 18 L1 HPV 33 CT, en donde el péptido L2 QLYQTCKATGTCPDVIPKV (HPV 33/HPV 11) se inserta entre la posición 432 - 433 en un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 18.

Quimera 10: Polipéptido quimérico HPV 16 L1 HPV 58 L2, en donde el péptido L2 GGLGIGTGSGTGGRTGYVPL (HPV 58/HPV 6) se inserta entre la posición 431 y la 431 de un L1 truncado en el extremo C a partir de HPV 16.

Ejemplo 2: Expresión, purificación y caracterización de síntesis de las quimeras de ejemplo

Producción de ácidos nucleicos recombinantes. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos quiméricos L1/L2 de ejemplo descritos en el Ejemplo 1 se obtuvieron mediante síntesis de genes antes de su clonación mediante manipulaciones genéticas estándares en un vector de expresión de Baculovirus. Los sitios de inserción se resumen en la Tabla 3. El truncamiento del extremo C de cada uno de los polipéptidos L1 dirigida a remover la señal de localización nuclear, así como el dominio de enlace de ADN presente en el extremo C de cada uno de los polipéptidos L1 (supresiones en

el extremo terminal C de 34, 35 aminoácidos, respectivamente para HPV 16, 18). Las secuencias de aminoácido de los truncados de L1 de HPV 16 y 18 como se usan en la presente se muestran en las figuras 1a y b, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del HPV 33 y de los péptidos HPV58 L2 se muestran en la Figura 2 (Figura 2(a), Figura 2(b), respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de las quimeras de ejemplo se proporcionan en SEQ ID NO: 36-45.

10 Cosecha de células. Los polipéptidos quiméricos de ejemplo se expresaron en células de *Trichoplusia ni* (High Five^{MR}) (a una densidad de aproximadamente 2 000 000 células/mililitro) infectadas con Baculovirus recombinante (MOI de 0.05-0.5) que codifica los polipéptidos quiméricos L1 / L2 de HPV 16 ó 18 de interés. Las células se cosecharon en el día 4 después de la infección mediante centrifugación a baja velocidad. Los aglomerados de células resultantes se almacenaron a -70°C.

20 Extracción de antígeno. Los polipéptidos quiméricos de ejemplo se extrajeron de las células High Five^{MR} en un proceso de extracción de dos pasos y clarificación. El paso de extracción de células se realizó con un regulador reductor e hipotónico (Tris 20 mM + β -mercaptoetanol (BME) al 4 por ciento, pH de 8.5). De manera alternativa, cuando la extracción es baja, el pH puede ser 8.7 y se
25 añade detergente Empigen al 2 por ciento. Un volumen igual a una

mitad o equivalente del volumen del cultivo se usó para realizar la extracción. Un tiempo de contacto de mínimo la mitad de una hora a temperatura ambiente se usó. La clarificación se realizó por centrifugación; si el sobrenadante está turbio, se realiza una
5 filtración opcional; a través del filtro Millistak COHC (Millipore) o equivalente.

Purificación y Caracterización. Los regímenes de purificación son muy similares para los diferentes polipéptidos quiméricos L1/L2, los polipéptidos quiméricos e incluyen los pasos de: cromatografía
10 de intercambio de aniones (Di o Tri metil amino etil - DMAE o TMAE), y cromatografía hidroxapatita.

Los regímenes de formación supramolecular varían ligeramente entre los polipéptidos quiméricos, difiriendo ligeramente por la adición de cloruro de sodio y Tween incluyendo los pasos de:
15 intercambio de regulador y remoción del BME a través de filtración en gel sobre Sephadex G25, maduración durante la noche y filtración esterilizante a 0.22 micras.

Los procesos de purificación se llevaron a cabo a temperatura ambiente, excepto para la maduración de las partículas parecidas a
20 virus que se llevó a cabo durante la noche a + 4°C. BME al 4 por ciento por volumen/volumen se añadió a todos los reguladores menos los finales con el fin de prevenir la formación de partículas parecidas a virus. Todos los reguladores usados se filtraron en filtros de 0.22 micras. Antes de cada corrida de purificación, se sanearon
25 las matrices y se equilibraron con regulador apropiado antes de la

carga de las muestras.

Cromatografía de intercambio de aniones TMAE o DMAE: El extracto clarificado se aplicó a la columna de intercambio de aniones (Dimetil-amino-etilo) previamente equilibrado en regulador de Tris 20 mM | NaCl 50 mM | β -mercaptoetanol (BME) al 4 por ciento, pH de 8.0 ± 0.2 . Después del lavado para despegar los polipéptidos, se realizó una elución con un gradiente lineal de regulador de Tris 20 mM | NaCl 50 a 250 mM | β -mercaptoetanol (BME) al 4 por ciento, pH de 8.0 ± 0.2 . El antígeno se eluyó dentro del gradiente de NaCl y el perfil de elución se monitoreó a 280 nanómetros. Las fracciones recolectadas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones positivas de L1/L2 se reunieron y se mantuvieron a $+4^{\circ}\text{C}$ antes de la siguiente columna.

Cromatografía de hidroxapatita: El eluido del paso previo se aplicó a una columna de hidroxapatita Tipo I (HA) previamente equilibrada en regulador (TRIS 20 mM | NaCl 180 mM | BME al 4 por ciento), pH de 8.0 ± 0.2 .

Después de la aplicación de la muestra, el gel se lavó con regulador de equilibrio y se eluyó con aproximadamente 10 volúmenes de columna de (fosfato de sodio 100 mM | NaCl 30 mM | BME al 4 por ciento), pH de 6.0 ± 0.2 . El eluido HA inmediatamente se diluyó hasta 40 mililitros con regulador de elución y se almacenó durante la noche a temperatura ambiente.

Los eluidos HA se aplicaron entonces a una columna de filtración en gel Sephadex G25 (M) (145 mililitros de volumen del

lecho) equilibrado en regulador (20 mM de fosfato de sodio | 500 mM de NaCl, pH de 6.0). En ciertos casos, el regulador se modificó a un contenido de cloruro de sodio de 100 mM). Los perfiles de elución se monitorearon a 280 nanómetros (para polipéptido) y 254 nanómetros (para BME). Los antígenos quiméricos L1/L2 se recolectaron en volumen al vacío mientras que los eluidos de BME a una etapa posterior y con diferente espectro del volumen total (Vt). La maduración se llevó a cabo mediante almacenamiento durante la noche a + 4°C. Después de la maduración, los depósitos de Sephadex que contenían los antígenos L1/L2 quiméricos se filtraron, a través de un filtro estéril de 0.22 micras y se almacenaron a -70°C. En ciertos casos, se añadió Tween 80 al 0.05 por ciento (volumen/volumen/ antes de la filtración. Un diagrama de flujo simplificado de un método para purificar los antígenos quiméricos L1/L2 de 800 mililitros de cultivo se ilustra en la Figura 5 a) - e).

Caracterización en microscopio electrónico (EM) de los antígenos quiméricos L1/L2. El microscopio electrónico se usó para caracterizar que las partículas están siendo formadas a partir de los polipéptidos quiméricos L1/L2 purificados, tales como partículas de polipéptidos y/o capsómeros y/o VLP similares a las producidas por las proteínas HPV-16 y HPV-18 L1 truncadas en el extremo C usadas como controles. El tamaño de las partículas parecidas a virus quiméricas pueden ser más chicas o más grandes que los controles. Las partículas de polipéptidos quiméricos L1/L2 purificadas se diluyeron a 50 microgramos/mililitro en su regulador respectivo

(como se muestra en la Tabla 3). Las muestras se prepararon para análisis de teñido negativo para microscopio electrónico de acuerdo con el método de teñido negativo de dos pasos estándar (Hayat M.A. & Miller S.E., 1990) usando acetato de uranilo (UAc) como agente de contraste. En pocas palabras, una rejilla de níquel (malla 400) con película de formar recubierta con carbón se flotó sobre una gota de la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la adsorción del material. La solución excedente se removió y el material se dejó secar al aire por menos de 2 minutos. La rejilla se puso a flotar brevemente (menos de 30 segundos) sobre una gota de agua destilada para remover las sales que pudieran precipitarse en el teñido. La rejilla se transfirió en una gota de teñido preparado de acuerdo con Harris (Harris, J.R., 1994); 2 por ciento de UAc (peso/volumen) en agua, suplementado con 1 por ciento de trehalosa (peso/volumen). La rejilla se punteó a secar después de 30 segundos. El material se dejó secar completamente (sobre 1 hora) y se examinó bajo el LEO Zeiss EM912Ω a 100 kV. Los campos representativos se formó se imagen a magnificación original de 100 K estándar y se resumen en la Tabla 4 y los resultados del microscopio electrónico mostraron que los polipéptidos quiméricos L1/L2 no son idénticos a los producidos por las partículas parecidas a virus L1 de HPV-16 o HPV-18 del tipo natural excepto por #5-L1-HPV16/L2^{DE17-36} y #8-L1-HPV18/L2^{DE17-36}. Las partículas formadas estaban ya sea bajo el estado VLP, estructuras amorfas o pequeñas y estructuras no VLP relativamente homogéneas.

Tabla 4

Resumen de resultados EM: Polipéptidos quiméricos L1/L2

5	Quimera	Regulador*	Observaciones
	#1	PO4 20 mM - NaCl 500 mM pH 6.0	Estructuras amorfas grandes
10	#1	PO4 20 mM - NaCl 500 mM tween 0.05% pH 6.0	Estructuras amorfas grandes
	#2	PO4 20 mM - NaCl 100 mM tween 0.05% pH 6.0	Agregados amorfos
15	#2	PO4 20 mM - NaCl 500 mM tween 0.05% pH 6.0	Estructuras pequeñas no VLP
20	#3	PO4 20 mM - NaCl 100 mM tween 0.05% pH 6.0	Agregados amorfos
25	#3	PO4 20 mM - NaCl 500 mM tween 0.05% pH 6.0	Estructuras pequeñas no VLP

5

10

15

20

25

Quimera	Regulador*	Observaciones
#4	PO4 20 mM - NaCl 500 mM tween 0.05% pH 6.0	Estructuras pequeñas no VLP
#5	PO4 20 mM - NaCl 500 mM tween 0.05% pH 6.0	VLP
#7	PO4 20 mM - NaCl 500 mM pH 6.0	Estructuras pequeñas no VLP
#8	PO4 20 mM - NaCl 500 mM pH 6.0	VLP
#9	PO4 20 mM - NaCl 500 mM tween 0.05% pH 6.0	Estructuras pequeñas no VLP
#10	PO4 20 mM - NaCl 500 mM tween 0.05% pH 6.0	Estructuras grandes amorphas

* Regulador de elución

Caracterización de anticuerpos de los antígenos quiméricos

L1/L2. La caracterización antigénica del componente L1 de las construcciones quiméricas L1/L2 purificadas se llevó a cabo mediante un ELISA en emparejado usando como recubrimiento ya sea H16.V5 (anticuerpo monoclonal específico neutralizante y de conformación; aminoácidos (aa) 266-297 y 339-365 críticos para enlazar HPV-16 L1 VLP), H18J4 (anticuerpo monoclonal específico neutralizante y de conformación), (localización del epítipo desconocida) sobre HPV-18 L1 VLP) o H16.U4 (anticuerpo monoclonal específico neutralizante y de conformación, epítipo desconocido en HPV-16 L1 VLP) purificada a partir de hibridomas proporcionados por el doctor Neil Christensen (Christensen y colaboradores, 1996, 2001). El ensayo se usó para demostrar la presencia de epítopos específicos conformacionales de HPV-16 o HPV-18 en los distintos antígenos quiméricos L1/L2 comparados con las preparaciones naturales de HPV-16 o HPV-18 VLP. El componente L2 de las construcciones quiméricas L1/L2 purificadas se caracterizó utilizando un ELISA directo al recubrir placas con construcciones quiméricas seguidas por la detección ya sea con policlonal de conejo dirigido a los aminoácidos 17-36 del péptido L2 HPV33/HPV11 o 56-75 HPV 58/HPV 6. Este ensayo mostró que el epítipo L2 está bien expuesto a la superficie del polipéptido quimérico L1/L2 excepto por #9-L1-HPV18/L2^{C17-36}.

La Tabla 5 resume los datos.

Tabla 5

5	Quimera #	H16. V5	H16. U4	H18. J4	pAb L2 17-36	pAb L2 56-75
	#1-L1-HPV18/L2 ^{DE56-75}	ND	ND	ND	ND	ND
10	#2-L1-HPV18/L2 ^{Ct56-75} (en NaCl 100 mM)	ND	ND	+	-	+
	#2-L1-HPV18/L2 ^{Ct56-75} (en NaCl 500 mM)	ND	ND	+	-	+
15	#3-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36- Ct56-75} (en NaCl 100 mM)	ND	ND	+	-	+
	#3-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36- Ct56-75} (en NaCl 500 mM)	ND	ND	-	+	+
20	#4-L1-HPV16/L2 ^{Ct56-76}	+	ND	ND	-	+
	#5-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36}	+	+	ND	+	-
25	#7-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36- Ct56-75}	+/-	ND	ND	+	+

5

10

Quimera #	H16. V5	H16. U4	H18. J4	pAb L2 17-36	pAb L2 56-75
#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36}	ND	ND	-	+	-
#9-L1-HPV18/L2 ^{C117-36}	ND	ND	+	-	-
#10-L1-HPV16/L2 ^{DE56-75}	-	ND	ND	-	+
HPV 16 L1VLP	+	+	-	ND	ND
HPV 18 L1 VLP	-	-	+	ND	ND

ND: no determinado.

15

Ejemplo 3: Método para probar la inmunogenicidad y la reactividad cruzada de los antígenos quiméricos L1/L2 en un modelo animal

20

25

Ratones BALB/c (típicamente, cuando menos 15 ratones por grupo) se inmunizaron intramuscularmente (por ejemplo, en un régimen de dosis múltiples de tres veces al día 0, 14 y 42) con 2 ó 10 microgramos del polipéptido quimera L1/L2 mencionado anteriormente solo o administrado con Cervarix, seguido por dos refuerzos dos y seis semanas más tarde. Después de un período conveniente (por ejemplo, en el día 14) siguiendo a la última inmunización, se monitorearon las respuestas de anticuerpo L1 específico inducidas por la vacunación mediante un ELISA de péptido y/o proteína. Las respuestas de anticuerpo L2 de reacción

cruzada y específica inducidas por la vacunación se pueden monitorear mediante ELISA de péptido y/o proteína. Las titulaciones de ELISA se calcularon a partir de una referencia por SoftMaxPro (usando una ecuación de cuatro parámetros) y se expresaron en EU/mililitro.

De manera alternativa, dos conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW, 1.5-2 kilogramos) se inmunizaron mediante administración intramuscular con 20 ó 100 microgramos del polipéptido quimera L1/L2 antes mencionado solo o administrado con Cervarix (por ejemplo, en un régimen de dosis múltiples de cuatro veces en el día 0, 14, 28 y 42). Las quimeras se formularon con Specol (de Cedi Dianostic), una emulsión de agua en aceite usada como un alternativo al adyuvante de Freund para la hiperinmunización de los conejos, preparado de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Serología anti-VLP (respuesta Ig). La cuantificación de un anticuerpo anti-VLP16 o VLP18 se llevó a cabo mediante ELISA usando HPV 16 VLP o HPV 18 VLP como un antígeno de recubrimiento.

Las tablas 6 y 7 resumen los datos en ratones y conejo, respectivamente.

Tabla 6
Enlace de antisuero de ratón inducido por los polipéptidos
quiméricos L1/L2 a HPV-16, 18 L1 VLP el día 14 después de la
última inmunización (ELISA)

5

10

15

20

25

Formulación	ELISA: Respuesta Anti- VLP L1 (EU/ml)					
	HPV-16			HPV-18		
	GMT	LL C195	UL C195	GMT	LL C195	UL C195
HPV16/18 L1 VLP 2 µg / AS04	1661845	1142855	2416516	2068578	1207914	3542483
#2-L1- HPV18/L2 C156-75 (en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04	434982	317060	596763	3165739	2296242	4364479
#5-L1- HPV16/L2 DE17-36 10 µg / AS04	1243267	912131	1694616	60647	41878	87828

5

10

15

20

25

Formulación	ELISA: Respuesta Anti- VLP L1 (EU/ml)					
	HPV-16			HPV-18		
	GMT	LL C195	UL C195	GMT	LL C195	UL C195
#8-L1- HPV18/L2 DE17-36 10 µg / AS04	197839	133820	292486	1586703	1326262	1898286
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #2-L1- HPV18/L2 Ct56-75 (en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04	658494	505689	857472	1550403	1201194	2001135
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #2-L1- HPV18/L2 Ct56-75	1096750	982819	1223889	2003694	1583281	2535739

5

10

15

20

25

Formulación	ELISA: Respuesta Anti- VLP L1 (EU/ml)					
	HPV-16			HPV-18		
	GMT	LL C195	UL C195	GMT	LL C195	UL C195
(en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04						
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #5- L1- HPV16/L2 DE17-36 2 µg / AS04	1171974	805890	1704356	1036944	700439	1535113
HPV16/18L1 VLP 2 µg + #5- L1- HPV16/L2 DE17-36 10 µg /	1901428	1327269	2723962	911637	653794	1271166

5

10

15

20

Formulación	ELISA: Respuesta Anti- VLP L1 (EU/ml)					
	HPV-16			HPV-18		
	GMT	LL C195	UL C195	GMT	LL C195	UL C195
AS04						
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #8-L1- HPV18/L2 DE17-36 2 µg / AS04	982738	779502	1238963	1504784	1210425	1870728
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #8-L1- HPV18/L2 DE17-36 10 µg / AS04	813835	631288	1049168	1261779	1061768	1499467

LL= Límite inferior; UL= Límite superior;

CI95= Intervalo de Confianza

El 100 por ciento de los sueros de ratón reaccionó con HPV16 y HPV18 L1 VLP mostrando que la inserción del epítopo L2 no afectó

la respuesta HPV-L1.

Tabla 7

Enlace de antisuero de conejo inducido por los polipéptidos
quiméricos L1/L2 a HPV-16, 18 L1 VLP el día 14 después de la
última inmunización (ELISA)

5

10

15

20

25

Formulación	Conejo #	Elisa: Respuesta anti- VLP L1 (EU/ml)	
		HPV-16	HPV-18
HPV16/18 L1 VLP 2 µg / AS04	TA368	57 037	21 995
	TA369	108 886	104 117
#2-L1-HPV18/L2 ^{C156-75} (en NaCl 100 mM) 100 µg /Specol	TA380	108 286	984 466
	TA381	47 879	785 301
#5-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36} 80 µg / Specol	TA382	165 675	6 540
	TA383	327 429	6 771

	Formulación	Conejo #	Elisa: Respuesta anti- VLP L1 (EU/ml)	
			HPV-16	HPV-18
5	#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 100 µg / AS04	TA370	5 049	62 505
10		TA371	2 851	55 907
15	#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 100 µg / Specol	TA376	16 039	688 188
		T377	8 673	575 679
20	HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 20 µg / AS04	TA372	80 313	70 839
		TA373	64 274	118 238
25	HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 20 µg /	TA374	1 136 885	850 922

5

10

15

Formulación	Conejo #	Elisa: Respuesta anti- VLP L1 (EU/ml)	
		HPV-16	HPV-18
Specol	TA375	396 871	474 109
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 100 µg / Specol	TA378	385 169	622 211
	TA379	579 951	1 037 924

El 100 por ciento de los sueros de conejo reaccionó con HPV16 y HPV18 L1 VLP mostrando que la inserción del epítopo L2 no afectó la respuesta HPV-L1.

Serología anti- péptido L2 (respuesta Ig). La cuantificación del anticuerpo anti-L2 se realizó mediante ELISA usando el péptido L2 (2 microgramos/mililitro) a partir de los virus de papiloma humano homólogos (péptidos L2 aminoácido 17-36 HPV33/HPV11 o péptidos L2 aminoácido 56-75 HPV58/HPV6) o heterólogos para valorar las respuestas de reacción cruzada y específica. Para la respuesta del anticuerpo L2 cruzada, se usaron los siguientes péptidos L2

sintéticos: aminoácido 17-36 de HPV-5, 6, 16, 31, 35, 52 y 56 o los aminoácidos 56-75 de HPV-58, 45, 33, 52, 5, 11, 56 y 35.

Medición ELISA del péptido L2 del virus de papiloma humano

Medición ELISA del péptido HPV L2

- 5 Los péptidos L2 (producidos por Eurogentec) se diluyeron a una concentración final de 2 microgramos/mililitro en PBS y se adsorbieron durante la noche a 4°C sobre los pozos de placas de microtitulación de 96 pozos (Maxisorp Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). Las placas se incubaron entonces durante 1 hora a 37°C
- 10 con PBS + Tween 20 al 0.1 por ciento + BSA al 1 por ciento (regulador de saturación). Los sueros diluidos en regulador de saturación se añadieron a las placas recubiertas con péptido HPV L2 y se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS y Tween 20 al 0.1 por ciento y
- 15 conjugado con biotina diluido anti-Ig en regulador de saturación se añadió a cada pozo y se incubó durante 1 hora para el reactivo anti-ratón (Dako, RU) o 1 hora 30 minutos para el reactivo anti-conejo (Amersham, RU) a 37°C. Después de un paso de lavado, se añadió peroxidasa de rábano estreptavidina (Dako, RU), diluida en regulador
- 20 de saturación durante 30 minutos adicionales a 37°C. Las placas se lavaron como se indicó anteriormente y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de o-fenilendiamina al 0.04 por ciento (Sigma) H₂O₂ al 0.03 por ciento en Tween 20 al 0.1 por ciento, regulador de citrato 0.05 M, pH de 4.5.
- 25 La reacción se detuvo con 2N H₂SO₄ y se leyó a 492/620

nanómetros. Las titulaciones del ELISA se calcularon en una referencia por SoftMaxPro (usando una ecuación de cuatro parámetros) y se expresaron en EU/mililitro.

Medición de ELISA HPV-L1

- 5 Las partículas parecidas a virus HPV-16/18 L1 se diluyeron a una concentración final de 1 microgramo/mililitro en PBS y se adsorbieron durante la noche a 4°C sobre los pozos de placas de microtitulación de 96 pozos (Maxisorp Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). Las placas se incubaron entonces durante 1 hora a 37°C
- 10 con PBS + Tween 20 al 0.1 por ciento + BSA al 1 por ciento (regulador de saturación). Los sueros diluidos en regulador de saturación se añadieron a las placas recubiertas de péptido HPV L1 y se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS Tween 20 al 0.1 por ciento e
- 15 inmunoglobulina anti-ratón conjugada con biotina (Dako, RU) o inmunoglobulina anti-conejo (Amersham RU) diluida en regulador de saturación se añadió a cada pozo y se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37°C. Después de un paso de lavado, se añadió peroxidasa de rábano estreptavidina (Dako, RU), diluido en regulador
- 20 de saturación durante 30 minutos adicionales a 37°C. Las placas se lavaron como se indica anteriormente y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de o-fenilendiamina al 0.04 por ciento (Sigma) H₂O₂ al 0.03 por ciento en Tween 20 al 0.1 por ciento, regulador de citrato 0.05 M, pH de 4.5.
- 25 La reacción se detuvo con 2N H₂SO₄ y se leyó a 492/620

nanómetros. Las titulaciones del ELISA se calcularon a partir de una referencia por SoftMaxPro (usando una ecuación de cuatro parámetros) y se expresaron en EU/mililitro.

La Tabla 8 resume los datos de inmunogenicidad en ratones.

5 Todos los antígenos de polipéptido quimérico L1/L2 indujeron respuestas de anticuerpo L2 dependientes de dosis significativa (titulaciones variando de 1687-18873) en ratones. Los resultados demostraron inmunogenicidad mejorada entre la post-tercera y post-cuarta inmunización (los datos no se muestran)

10

Tabla 8

Enlace de antisuero de ratón inducido por los polipéptidos quiméricos L1/L2 al péptido L2 homólogo 17-36 del HPV 33 ó al péptido L2 56-75 péptido HPV 58 el día 14 después de la última inmunización (ELISA).

15

Formulación	ELISA: Respuesta anti- péptido L2 (EU/ml)					
	Péptido L2 17-36 HPV 33			Péptido L2 56-75 HPV 58		
	GMT	LL	UL	GMT	LL	UL
	C195	C195	C195	C195	C195	C195
#2-L1-HPV18/L2 C156-75 (en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04	NT	NT	NT	13957	9972	19533

20

25

5

10

15

20

25

Formulación	ELISA: Respuesta anti- péptido L2 (EU/ml)					
	Péptido L2 17-36 HPV 33			Péptido L2 56-75 HPV 58		
	GMT	LL C195	UL C195	GMT	LL C195	UL C195
#5-L1-HPV16/L2 DE17-36 10 µg / AS04	6116	2953	12665	NT	NT	NT
#8-L1-HPV18/L2 DE17-36 10 µg / AS04	18873	11898	29937	NT	NT	N5
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #2-L1- HPV18/L2 C156-75 (en NaCl 100 mM) 2 µg / AS04	NT	NT	NT	3199	1401	7308
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #2-L1- HPV18/L2 C156-75 (en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04	NT	NT	NT	12653	6037	26520
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #5-L1-	1687	866	3285	NT	NT	NT

5

10

15

20

25

Formulación	ELISA: Respuesta anti- péptido L2 (EU/ml)					
	Péptido L2 17-36 HPV 33			Péptido L2 56-75 HPV 58		
	GMT	LL C195	UL C195	GMT	LL C195	UL C195
HPV16/L2 ^{DE17-36} 2 µg / AS04						
HPV16/18L1 VLP 2 µg + #5-L1- HPV16/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	2405	1565	3695	NT	NT	NT
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #8-L1- HPV18/L2 ^{DE17-36} 2 µg / AS04	3965	1631	9639	NT	NT	NT
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #8-L1- HPV18/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	11971	7242	1986	NT	NT	NT

LL= Límite inferior; UL= Límite superior;

CI95= Intervalo de Confianza

Las Tablas 9 y 10 resumen los datos del ELISA en conejo para la secuencia de péptido 17-36 y 56-75, respectivamente.

5 Todos los antígenos de polipéptido quimérico L1/L2 indujeron respuestas significativas del anticuerpo L2 de reacción cruzada y específico dependiente de la dosis en conejos. La respuesta de L2 fue específica ya que los antisueros de conejos inmunizados con el polipéptido quimera L1/L2 contenían los aminoácidos 17-36 de L2 no
10 hicieron reacción cruzada con los péptidos de L2 sintéticos de los aminoácidos 56-75 de L2 y viceversa (los datos no se muestran).

Se observó una buena reactividad cruzada con la mayoría de los péptidos L2 sintéticos de los aminoácidos 17-36 de las
15 secuencias de L2 (Tabla 9). La reactividad puede depender en las aminoácidos en la posición 30: a Pro (P) remplazado por una clase de aminoácidos diferente tal como S o E en todos los aminoácidos sintéticos con reactividad cruzada o sin ella (aminoácido 17-36 de L2 HPV-31 y -56). De manera similar se observó una relativamente
20 buena reactividad cruzada con todos los péptidos L2 sintéticos la secuencia de aminoácido 56-75 de L2 (Tabla 10). La reactividad puede depender del aminoácido en la posición 70: a Thr (T) remplazada por un aminoácido diferente tal como Ala (A) no tuvieron reacción cruzada (aminoácido 56-75 de L2 HPV-11, -52 y -56).

25

Tabla 9

Enlace de antisuero de conejo inducido por los polipéptidos
quiméricos L1/L2 al péptido L2 péptido 17-36 el día 14 después
de la última inmunización (ELISA)

5

10

15

20

25

Formulación	Conejo id#	Elisa: Respuesta anti-péptido L2 respuesta de péptido 17-36 (EU/ml)							
		HPV- 5	HPV- 6	HPV- 11*	HPV- 16	HPV- 31	HPV- 35	HPV- 52	HPV- 56
#5-L1- HPV16/L2 DE17-36	TA382	64 367	73 243	90 769	53 601	5 410	39 251	139 671	1 362
	TA383	77 393	160 437	154 321	70 389	2 019	49 784	>216 561	900
#8-L1- HPV18/L2 DE17-36	TA370	5 627	8 792	12 594	8 971	1 593	6 063	18 825	1
	TA371	3 065	7 100	11 295	3 135	314	2 882	17 153	84

5

10

15

20

25

Formulación	Conejo id#	Elisa: Respuesta anti-péptido L2 respuesta de péptido 17-36 (EU/ml)							
		HPV- 5	HPV- 6	HPV- 11*	HPV- 16	HPV- 31	HPV- 35	HPV- 52	HPV- 56
#8 -L1- HPV18/L2 DE17-36	TA376	33 379	74 976	109 514	38 514	3 366	29 864	151 811	3 354
100 µg Specol	TA377	>171 000	>208 165	>213 208	>190 137	4 840	>124 546	>216 561	2 726
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-	TA372	1 533	1 370	1 633	1 517	490	1 192	2 639	264
HPV18/L2 DE17-36 20 µg AS04	TA373	16 603	18 684	22 998	16 788	347	14 309	29 593	253
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-	TA374	1 277	4 484	10 479	2 832	2 362	1 689	12 252	412

5

10

15

20

Formulación	Conejo id#	Elisa: Respuesta anti-péptido L2 respuesta de péptido 17-36 (EU/ml)							
		HPV- 5	HPV- 6	HPV- 11*	HPV- 16	HPV- 31	HPV- 35	HPV- 52	HPV- 56
HPV18/L2 DE17-36 20 µg Specol	TA375	10 217	15 197	18 916	11 226	651	5 863	29 216	841
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-	TA378	25 542	31 141	35 927	19 519	2 329	10 434	36 378	503
HPV18/L2 DE17-36 100 µg Specol	TA379	39 846	44 095	73 486	30 542	1 790	22 358	101 784	494

* 17-36 HPV11/HPV33 homólogos L2 péptido = tipo específico

25

Tabla 10

Enlace de antisuero de conejo inducido por los polipéptidos quiméricos L1/L2 al péptido L2 56-75 el día 14 después de la última inmunización (ELISA)

5	Formulación	Conejo id#	ELISA: Respuesta anti-péptido L2 respuesta de péptido 56-75 (EU/ml)							
			HPV- 58	HPV- 45	HPV- 33	HPV- 52	HPV- 5	HPV- 11	HPV- 56	HPV- 35
10	#2 L1/L2 (en NaCl 100 mM)	TA380	7 235	4 647	7 679	34	2 881	48	38	2 091
	100 µg Specol	TA381	1 065	1 201	484	721	550	722	798	934

* 56-75 HPV58/HPV6 homólogos L2 péptido = tipo específico

Experimento de neutralización. Dos semanas después de la tercera y/o cuarta inmunización, los sueros se diluyeron con regulador de prueba de neutralización (8 diluciones seriales de cuatro veces - la dilución inicial comenzó en 1/10 para los sueros de conejo y 1/40 para los ratones) y se mezcló con pseudovirus infeccioso (PsV) de los tipos de virus de papiloma humano que son los mismos que y diferentes al o los usados durante la inmunización. La mezcla se hizo reaccionar durante una hora a 4°C y se añadió a las células 293 TT

(30 000 células por pozo) que habían sido plaqueadas cuando menos dos horas antes pero no más de 4.5 horas. Después de cultivarlas durante 72 horas con de CO₂ al 5 por ciento. El sobrenadante se recuperó y se midió la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (SeAP) (el ensayo de neutralización esencialmente como se describe en Pastrana y colaboradores 2004 modificado en que las unidades de luz relativa se optimizaron para estar en el intervalo lineal (por ejemplo entre 75-100 RLU). Las titulaciones de neutralización se expresaron como el recíproco de la dilución de suero conduciendo a una reducción al 50 por ciento de la señal de actividad SeAP generada por la infección de PsV en ausencia del suero. Las titulaciones de neutralización por debajo de 40 se consideran debajo del corte.

La Tabla 11 resume los datos en ratones.

15

Tabla 11

Neutralización de pseudo-viriones HPV-6, 11, 16, 18, 33, 58 mediante el antisuero inducido por los polipéptidos quiméricos L1/L2 en ratones en el día 14 después de la tercera inmunización.

20

Grupos de formulación	Caldo de ratones Nº (n = 5/caldo)	HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
HPV-16/18 L1 VLP 2	10.1	<40	<40	584	>655	<40	<40

25

5

10

15

20

25

Grupos de formulación	Caldo de ratones Nº (n = 5/caldo)	HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
µg / AS04				166	360		
	10.2	<40	<40	170 400	>655 360	<40	<40
	10.3	<40	<40	449 492	161 388	<40	<40
#2-L1-HPV18/L2 ^{Ct56-75} (en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04	6.1	<40	<40	<40	326 306	<40	<40
	6.2	<40	<40	<40	234 682	<40	<40
	6.3	<40	<40	<40	337 657	<40	<40
#5-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	9.1	<40	566	289 420	<40	1 279	<40
	9.2	<40	245	271 534	<40	604	<40

		Caldo de ratones Nº (n = 5/caldo)	HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
5		9.3	<40	130	107 562	<40	424	61
10	#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-} ³⁶ 10 µg / AS04	3.1	<40	341	<40	>655 360	314	<40
		3.2	<40	943	<40	354 052	1 543	<40
15	HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #2 L1/L2 (en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04	4.1	<40	<40	555 880	214 660	<40	<40
		4.2	<40	<40	150 417	138 334	<40	<40
20		4.3	<40	<40	>655 360	73 465	<40	<40
25	HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #5-L1-HPV16/L2 ^{DE17-} ³⁶ 10 µg / AS04	7.1	<40	<40	186 990	15 578	<40	<40
		7.2	<40	70	253	85	208	369

5	Grupos de formulación	Caldo de ratones Nº (n = 5/caldo)	HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
10					409	175		
		7.3	<40	81	>655 360	98 651	231	<40
15	HPV-16/18 L1 VLP 2 µg + #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	1.1	<40	368	174 526	254 121	348	214
		1.2	<40	1 134	>655 360	192 239	1 026	<40
		1.3	<40	607	>655 360	110 914	399	<40

*HPV33/11 y HPV5816 PsV representa específico del tipo para los péptidos L2 respectivamente 17-36 HPV33/HPV11 y Péptido L2 56-75 HPV58/HPV6.

Los antígenos del polipéptido quimérico L1/L2 #5-L1-HPV16/L2^{DE17-36} y #8-L1-HPV18/L2^{DE17-36} inmunizados solos indujeron anticuerpos neutralizantes específicos detectables (titulaciones variando de 262 a 696) cuando se probó en ratones (Tabla 10) excepto #2-L1-HPV18/L2^{C56-75}. Cuando se combinó con los

antígenos de polipéptido quimérico L1/L2 HPV16/18 L1 VLP #5-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36} y #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} indujeron todavía anticuerpos neutralizantes detectables pero a un grado menor (las titulaciones variando de 61 a 633).

5

Tabla 11b

Neutralización de los pseudo-viriones HPV-6, 11, 16, 18, 33, 58 mediante el antisuero inducido por los polipéptidos quiméricos L1/L2 en ratones en el día 14 después de la tercera inmunización

10

15

20

25

Grupos de Formulación	Titulaciones Seudo-neutra (ED50)					
	HPV-6*	HPV-11*	HPV-16	HPV-18	HPV-33*	HPV-58*
	GMT	GMT	GMT	GMT	GMT	GMT
HPV-16 / 18 L1 VLP 2 µg / AS04	<40	<40	355012	410781	<40	<40
#2-L1-HPV18/L2 ^{C156-75} (en NaCl 100 mM) 10 µg / AS04	<40	<40	<40	295706	<40	<40
#5-L1-HPV16/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	<40	262	203706	<40	689	46
#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	<40	567	<40	481697	696	<40
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #2 L1-HPV18/L2 ^{C156-75} (en NaCl 100	<40	<40	379827	129694	<40	<40

5

10

15

20

25

Grupos de Formulación	Titulaciones Seudo-neutra (ED50)					
	HPV- 6*	HPV -11*	HPV- 16	HPV- 18	HPV -33*	HPV -58*
	GMT	GMT	GMT	GMT	GMT	GMT
mM) 10 µg / AS04						
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #5-L1- HPV16/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	<40	61	314321	50774	124	84
HPV16/18 L1 VLP 2 µg + #8-L1- HPV18/L2 ^{DE17-36} 10 µg / AS04	<40	633	421638	175640	522	70

*HPV33/11 y HPV5816 PsV representa específico del tipo para los péptidos L2 respectivamente 17-36 HPV33/HPV11 y Péptido L2 56-75 HPV58/HPV6.

Las tablas 12 y 13 resumen los datos de la neutralización en los conejos en el día 14 después de la tercera y la cuarta inmunización respectivamente.

La mayoría de los antígenos del polipéptido quimérico L1/L2 examinados indujo anticuerpos de neutralización cruzada y estructura detectable en los conejos (Tabla 12 y 13) excepto en el quimera L1/L2 #2 (en NaCl 100 mM). La presentación del péptido L2 56-75 HPV58/HPV11 puede no ser óptima para inducir anticuerpos de neutralización a pesar de la observación de que este quimérico indujo titulaciones en ELISA. La inserción de los péptidos L2 en los

polipéptidos quiméricos L1/L2 no interfirió con la inducción de los anticuerpos de neutralización de alta titulación dirigidos contra HPV-16 o HPV-18 L1 (Tabla 11 y 12). Los polipéptidos quiméricos L1/L2 #8 formulados en Specol indujeron aproximadamente 2 veces más altas titulaciones de neutralización en comparación con la formulación de Alum-MPL (Tabla 13). La inmunización con la quimera L1/L2 sola indujo anticuerpos de neutralización significativamente altos para HPV16 o HPV-18 lo cual refleja la respuesta de anticuerpos a la proteína portadora HPV-16 o HPV-18 L1 VLP. Más aún, se observó buena neutralización del HPV-33, 58 de alto riesgo para el polipéptido quimérico L1/L2 #5 y a un menor grado del polipéptido quimérico L1/L2 #8. Además se detectó neutralización del HPV-6 y 11 de bajo riesgo para ambos sueros de conejo (Tabla 13).

Tabla 12

Neutralización de los pseudo-viriones HPV-6, 11, 16, 18, 33, 58 mediante el antisuero inducido por los polipéptidos quiméricos L1/L2 en conejos en el día 14 después de la tercera inmunización.

Formulación	Conejo id#	Titulaciones pseudoneutras (ED50)					
		HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
HPV16/18 L1	TA368	<40	<40	8 995	15 357	50	<40

5

10

15

20

25

Formulación	Conejo id#	Titulaciones pseudoneutras (ED50)					
		HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
VLP 2 µg /							(<10)
AS04	TA369	<40	<40	76 400	180 798	<40 (<10)	<40 (<10)
L1/L2#2 (en NaCl 100 mM)	TA380	<40	<40	<40	221 849	<40 (<10)	<40 (<10)
100 µg / Specol	TA381	<40	<40	<40	216 003	<40 (<10)	<40 (<10)
#5 -L1- HPV16/L2 DE17-36	TA382	3 414	428	111 733	49	1 879	118
80 µg Specol	TA383	2 336	6 841	>163 840	69	1 167	231

5

10

15

20

25

Formulación	Conejo id#	Titulaciones pseudoneutras (ED50)					
		HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
#8-L1- HPV18/L2 DE17-36	TA370	<40	<40	<40	47 215	<40 (17)	<40 (18)
100 µg / AS04	TA371	<40	<40	<40	14 778	51	<40 (<10)
#8-L1- HPV18/L2 DE17-36	TA376	<40	141	101	114 542	306	124
100 µg Specol	TA377	<40	<40	61	125 200	58	51
HPV16/18 L1 VLP + #8-L1-	TA372	282	102	28 157	76 596	<40 (12)	91
HPV18/L2 DE17-36 20 µg /	TA373	59	<40	>163 840	129 531	140	<40 (23)

5

10

15

20

25

Formulación	Conejo id#	Titulaciones pseudoneutras (ED50)					
		HPV 6*	HPV 11*	HPV 16	HPV 18	HPV 33*	HPV 58*
As04							
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-	TA374	2 319	198	>163 840	235 557	336	141
HPV18/L2 DE17-36 20 µg / Specol	TA375	<40	<40	>163 840	91 991	44	<40 (<10)
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-	TA378	<40	135	>163 840	197 836	292	<40 (22)
HPV18/L2 DE17-36 100 µg / Specol	TA379	242	<40	>163 840	>163 840	416	188

*HPV33/11 y HPV5816 PsV representa específico del tipo para los péptidos L2 respectivamente 17-36 HPV33/HPV11 y Péptido L2 56-75 HPV58/HPV6.

Tabla 13

Neutralización de los pseudo-viriones HPV-6, 11, 16, 18, 33, 58
mediante el antisuero inducido por los polipéptidos quiméricos
L1/L2 en conejos en el día 14 después de la cuarta inmunización

5	Formulación	Conejo id#	Titulaciones pseudoneutras (ED50)			
			HPV 6*	HPV 11*	HPV 33*	HPV 58*
10	HPV16/18 L1 VLP 2 µg / AS04	TA368	<40	<40	48	<40
		TA369	<40	<40	<40	<40
15	#2-L1-HPV18/L2 ^{Ct56-75} (en NaCl 100 mM) 100 µg / Specol	TA380	<40	<40	<40	<40
		TA381	<40	<40	<40	<40
	#5 -L1-HPV16/L2 ^{DE17-36} 80 µg / Specol	TA382	5 303	1 608	2 287	4 784
		TA383	2 814	8 617	4 640	2 448
20	#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 100 µg / AS04	TA370	<40	64	99	768
		TA371	43	359	667	1 019
25	#8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 100 µg / Specol	TA376	<40	345	641	3 436
		TA377	<40	<40	<40	<40

5

10

15

Formulación	Conejo id#	Titulaciones pseudoneutras (ED50)			
		HPV 6*	HPV 11*	HPV 33*	HPV 58*
HPV16/18 L1 VLP 10 µg + #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 20 µg / As04	TA372	288	89	<40	74
	TA373	<40	<40	<40	<40
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 100 µg / Specol	TA374	2 623	1 113	2 455	2 400
	TA375	282	76	113	180
HPV16/18 L1 VLP 20 µg + #8-L1-HPV18/L2 ^{DE17-36} 100 µg / Specol	TA378	119	412	1 141	1 331
	TA379	186	475	1 163	2 201

20

*HPV33/11 y HPV5816 PsV representa específico del tipo para los péptidos L2 respectivamente 17-36 HPV33/HPV11 y Péptido L2 56-75 HPV58/HPV6.

25

En otro experimento el quimera #2 purificado como una construcción pequeña de partícula no parecida a virus y quimera 3 se formularon en el adyuvante AS04 (Alum 3D-MPL) y se administraron por separado al conejo y se probaron en ELISA para determinar la

respuesta del antipéptido 17-36, y antipéptido 56-75 y anti HPV L1. Después de la segunda inmunización se obtuvieron los siguientes datos.

5

Tabla 14

Inmunogenicidad en Conejos de Quimera L1/L2 anti L2¹⁷⁻³⁶
(segunda inmunización)

10

15

20

25

	Titulaciones Anticuerpo					
	Anti-péptido L2 ¹⁷⁻³⁶					
	HPV- 6	HPV- 11	HPV- 16	HPV- 35	HPV -52	HPV -59
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/C156- 75} 20 µg/AS04	1033	2137	1245	718	2328	114
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/C156- 75} 100 µg/AS04	608	1323	484	769	883	87
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/C156- 75} 20 µg / Cebador AS04 - refuerzo Alum	851	2035	830	923	2088	69
#8-L1-HPV18 ^{DE17-36} 100 µg/AS04	NT	2076	NT	NT	NT	NT

Tabla 15

Inmunogenicidad en Conejo de Quimera L1/L2- antiL2⁵⁶⁻⁷⁵
(segunda inmunización)

5

10

15

20

25

		Titulaciones Anticuerpo Anti-Péptido L2 ⁵⁶⁻⁷⁵				
		HPV -5	HPV- 11	HPV- 33	HPV- 45	HPV- 58
#2-L1-HPV18 ^{Ct56-75} 20 µg/AS04		248	144	532	553	853
#2-L1-HPV18 ^{Ct56-75} 100 µg/AS04		15	465	170	138	135
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/Ct56-75} 20 µg / AS04		21	22	55	77	73
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/Ct56-75} 100 µg/AS04		79	1296	809	645	141
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/Ct56-75} 20 µg / Cebador AS04 - refuerzo Alum		54	460	232	93	2061

Tabla 16
Inmunogenicidad en Conejo de Quimera L1/L2 – anti-HPV 18L1
(segunda inmunización)

5

10

15

20

	Titulaciones Anti-HPV-18 L1 Ab
#2-L1-HPV18 ^{Ci56-75} 20 µg/AS04	86573
#2-L1-HPV18 ^{Ci56-75} 100 µg/AS04	88567
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/Ci56-75} 20 µg / AS04	58734
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/Ci56-75} 100 µg/AS04	67833
#3-L1-HPV18 ^{DE17-36/Ci56-75} 20 µg / Cebador AS04 - refuerzo Alum	40754

25

APÉNDICE: LISTA DE REFERENCIAS

Alphs HH, Gambhira R, Karanam B, Roberts JN, Jagu S, Schiller JT, Zeng W, Jackson DC, Roden RB. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. Proc Natl Acad Sci, EUA, 15 de abril de 2008; 105(15): 5850-5. Publicación Electrónica 14 de abril de 2008.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. Nucleic Acids Res. 36 (Publicación Base de Datos): D25-30 (2008).

Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND, Zhao R, Chen XS. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. J Biol Chem. 26 de octubre de 2007; 282(43): 31803-11. Publicación Electrónica 4 de septiembre de 2007.

Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.-C., Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O'Donovan C., Phan I., Pilbout S., Schneider M. The SWISS-PROT Protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. Nucleic Acids Res. 31: 365-370 (2003)

Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, Christensen ND, Galloway DA. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. J Virol. Noviembre de 2003; 77 (21): 11625-32.

Carter JJ, Wipf GC, Madeleine MM, Schwartz SM, Koutsky LA, Galloway DA. Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera. *J Virol.* Mayo de 2006; 80(10): 4664-72.

- 5 Chen X.S, Garcea R.L, Goldberg I, Casini G, Harrison S.C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16, *Mol Cell* 2000, 5, 557-567

- Christensen ND, Cladel NM, Reed CA, Budgeon LR, Embers ME, Skulsky DM, McClements WL, Ludmerer SW, Jansen KU. Hybrid
10 papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology.* 20 de diciembre de 2001; 291(2): 324-34.

- Christensen N D, Dilner J, Eklund C, Carter J J, Wipf GC, Reed
15 CA, Cladel, N M, Galloway DA Surface, Linear and Conformational epitopes on HPV-16 and HPV-18 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies, *Virology*, 223, 174-184 (1996).

- Combita AL, Touzé A, Bousarghin L, Christensen ND, Coursaget P. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes
20 within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol.* Julio de 2002; 76(13): 6480-6.

- Day PM, Thompson CD, Buck CB, Pang YY, Lowy Dr, Schiller JT. Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. *J Virol.* Agosto
25 de 2007; 81(16): 8784-92. Publicación Electrónica 6 de junio de

2007.

Deschuyteneer M, Elouahabi A, Plainchamp D, Plisnier M, Soete D, Corazza Y, Lockman L, Giannini S and Deschamps M. Molecular and structural characterization of the L1-Virus Like Particles that are used as vaccine antigens in Cervarix^{MR}, the AS04-
5 adjuvanted HPV-16 and -18 cervical cancer vaccine

Dessy FJ, Giannini SL, Bougelet CA, Kemp TJ, David MP, Poncelet SM, Pinto LA, Wettendorff MA. Correlation between direct ELISA, single epitope-based inhibition ELISA and pseudovirion-based
10 neutralization assay for measuring anti-HPV-16 and anti-HPV-18 antibody response after vaccination with the AS04-adjuvanted HPV-16/18 cervical cancer vaccine. Hum Vaccin. Noviembre-Diciembre de 2008; 4(6): 425-34. Publicación Electrónica 11 de noviembre de 2008.

15 Embers ME, Budgeon LR, Pickel M, Christensen ND, Protective immunity to rabbit oral and cutaneous papillomaviruses by immunisation with short peptides of L2, the minor capsid protein. J Virol. Octubre de 2002; 76(19): 9798-805.

Gambhira R, Karanam B, Jagu S, Roberts JN, Buck CB, Bossis
20 I, Alphas H, Culp T, Christensen ND, Roden RB. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. J Virol. Diciembre de 2007; 81(24): 13927-31. Publicación Electrónica 10 de octubre de 2007.

Harris, J.R., 1994, Proc. ICEM XIII, Les Editions de Physique,
25 ed., página 557.

Hayat M.A. y Miller S.E., 1990, Negative Staining, Editorial McGraw - Hill.

Kawana K, Matumoto K, Yoshikawa H, Kawana T, Yoshiike K, Kanda T. A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. *Virology* 1998, 245, 353-359

Kawana K, Yoshikawa H, Tackentani Y, Yoshiike K, Kanda T. In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *Journal of Virology* 1999, 73, 6188-6190.

Kawana K, Kawana Y, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T. Nasal immunization of mice with peptide having a cross-neutralization epitope on minor capsid protein L2 of human papillomavirus type 16 elicit systemic and mucosal antibodies. *Vaccine*. 8 de enero de 2001; 19(11-12): 1496-502.

Kawana K, Yasugi T, Kanda T, Kino N, Oda K, Okada S, Kawana Y, Nei T, Takada T, Toyoshima S, Tsuchiya A, Kondo K, Yoshikawa H, Tsutsumi O, Taketani Y. Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine*. 1 de octubre de 2003; 21(27-30): 4256-60.

Kondo K, Ishii Y, Ochi H, Matsumoto T, Yoshikawa H, Kanda T. Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology*. 20 de febrero de 2007; 358(2). 266-72. Publicación

Electrónica 28 de septiembre de 2006.

Kondo K, Ochi H, Matsumoto T, Yoshikawa H, Kanda T. Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. J Med Virol. Mayo de 2008; 80(5): 841-6.

Pastrana DV, Buck CB, Pang YY, Thompson CD, Castle PE, FitzGerald PC, Krüger Kjaer S, Lowy DR, Schiller JT. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. Virology. 10 de abril de 2004; 321(2): 205-16.

Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. Oncologist. Agosto de 2005; 10(7): 528-38. Review.

Quint WG, Pagliusi SR, Lelie N, de Villiers EM, Wheeler CM; World Health Organization Human Papillomavirus DNA International Collaborative Study Group. Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human papillomavirus DNA Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human papillomavirus DNA. J Clin Microbiol. Febrero de 2006; 44(2). 571-9

Sadeyen J.R, Tourne S, Shkreli M, Sizaret P.Y, Coursaget P. Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope. Virology 309 (2003) 32-40

Slupetzky K, Shafti-Keramat, Lenz P, Brandt S, Grassauer A, Sara M and Kirnbauer R. Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops. *Journal of General Virology* 2001, 82, 2799-2804

5 Slupetzky K, Gambhira R, Culp T, Shafti-Keramat S, Schellenbacher C, Christensen N.D, Roden R, Kirnbauer R. A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vaccine* 25 (2007) 2001-2010

10 Varsani A, Williamson AL, de Villiers D, Becker I, Christensen ND, Rybicki EP. Chimeric human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16. *J Virol.* Agosto de 2003; 77(15): 8386-93.

15 Y.-F. Xul, Y.-Q. Zhang 2, X.-M. Xul, and G.-X. Songl. Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Arch Virol* (2006) 151: 2133-2148.

20

25

Secuencias de Aminoácidos de los Polipéptidos Quiméricos de
Ejemplo L1/L2

HPVchim01 (SEQ ID NO: 36)

5	1	MALWRPSDNT	VYLPPPSVAR	VVNTDDYVTR	TSIFYHAGSS	RLLTVGNPYF	RVPAGGGNKQ
	61	DIPKVSAYQY	RVFRVQLPDP	NKFGLPDNSI	YNPETQRLVW	ACVGVEIGRG	QPLGVGLSGH
	121	PFYNKLDDE	SSHAATSGGL	GIGTSGTGG	RTGYVPLNVS	EDVRDNVSVD	YKQTQLCILG
	181	CAPAIGEHW	KGTACKSRPL	SQGDCPPLEL	KNTVLEDGDM	VDGTYGAMDF	STLQDTKCEV
	241	PLDICQSICK	YPDYLQMSAD	PYGDSMFFCL	RREQLFFARHF	WNRAGTMGDT	VPPSLYIKGT
	301	GMRASPGSCV	YSPSPSGSIV	TSDSQLFNKP	YWLHKAQGHN	NGVCWHNQLF	VTVVDTTTST
10	361	NLTICASTQS	PVPGQYDATK	FKQYSRHVEE	YDLQFIFQLC	TITLTADVMS	YIHSMNSSIL
	421	EDWNFGVPPP	PTTSLVDTYR	FVQSVAITCQ	KDAAPAENKD	PYDKLKFWNV	DLKEKFSLDL
	481	DQYPLGRKFL	VQ				

HPVchim02 (SEQ ID NO: 37)

15	1	MALWRPSDNT	VYLPPPSVAR	VVNTDDYVTR	TSIFYHAGSS	RLLTVGNPYF	RVPAGGGNKQ
	61	DIPKVSAYQY	RVFRVQLPDP	NKFGLPDNSI	YNPETQRLVW	ACVGVEIGRG	QPLGVGLSGH
	121	PFYNKLDDE	SSHAATSNVS	EDVRDNVSVD	YKQTQLCILG	CAPAIGEHW	KGTACKSRPL
	181	SQGDCPPLEL	KNTVLEDGDM	VDGTYGAMDF	STLQDTKCEV	PLDICQSICK	YPDYLQMSAD
	241	PYGDSMFFCL	RREQLFARHF	WNRAGTMGDT	VPPSLYIKGT	GMRASPGSCV	YSPSPSGSIV
	301	TSDSQLFNKP	YWLHKAQGHN	NGVCWHNQLF	VTVVDTTTST	NLTICASTQS	PVPGQYDATK
20	361	FKQYSRHVEE	YDLQFIFQLC	TITLTADVMS	YIHSMNSSIL	EDWNFGVPPP	PTTSLVDTYR
	421	FVQSVAITCQ	KDGLGIGTG	SGTGGRTGYV	PLAAPAENKD	PYDKLKFWNV	DLKEKFSLDL
	481	DQYPLGRKFL	VQ				

HPVchim03 (SEQ ID NO: 38)

25	1	MALWRPSDNT	VYLPPPSVAR	VVNTDDYVTR	TSIFYHAGSS	RLLTVGNPYF	RVPAGGGNKQ
	61	DIPKVSAYQY	RVFRVQLPDP	NKFGLPDNSI	YNPETQRLVW	ACVGVEIGRG	QPLGVGLSGH
	121	PFYNKLDDE	SSHAATSQLY	QTCKATGTC	PDVIPKNVS	EDVRDNVSVD	YKQTQLCILG

181	CAPAIGEHW	KG	TACKSRPL	SQ	GDCPPLEL	KNT	BLEDGDM	VD	TGYGAMDF	ST	LQDTKCEV
241	PLDICQSICK	Y	PDYLQMSAD	P	YGDSMFFCL	R	REQLFARHF	W	NRAGTMGDT	V	PPSLYIKGT
301	GMRASPGSCV	Y	SPSPSGSIV	T	SDSQLFNKP	Y	WLHKAQGHN	N	GCW	H	NQLF
361	NLTICASTQS	P	VPGQYDATK	F	KYSRHVEE	Y	D	LQFIFQLC	T	I	L
421	EDWNFGVPPP	P	TTSLVD	T	YR	F	VQSV	A	I	T	CQ
5 481	PYDKLKFWNV	D	LKEKFS	L	D	L	QYPLGRKFL	V	Q		

HPVchim04 (SEQ ID NO: 39)

1	WSLWLPSEAT	V	Y	L	P	P	V	P	V	S	K
61	LVPKVSG	L	Q	Y	R	V	F	R	I	H	L
121	PLL	N	K	L	D	D	T	E	N	A	S
10 181	NPGDCPPLEL	I	N	T	V	I	Q	D	G	D	M
241	PYGDSLFFYL	R	R	E	Q	M	F	V	R	H	L
301	TSDAQIFNKP	Y	W	L	Q	R	A	Q	G	H	N
361	KEYLRHGEEY	D	L	Q	F	I	F	Q	L	C	K
421	VTSQAIACQK	H	G	G	L	G	I	G	T	G	S
481	QFPLGRKFLL	Q									

15

HPVchim05 (SEQ ID NO: 40)

1	WSLWLPSEAT	V	Y	L	P	P	V	P	V	S	K
61	LVPKVSG	L	Q	Y	R	V	F	R	I	H	L
121	PLL	N	K	L	D	D	T	E	N	A	S
181	CKPPIGEHWG	K	G	S	P	C	T	N	V	A	V
20 241	PLDICTSICK	Y	P	D	I	K	M	V	S	E	
301	GSTANLASSN	Y	F	P	T	P	S	G	S	M	V
361	NMSLCAAIST	S	E	T	T	Y	K	N	T	N	F
421	DWNFLQPPP	G	G	T	L	E	D	T	Y	R	F
481	QFPLGRKFLL	Q									

25

HPVchim06 (SEQ ID NO: 41)

	1	WSLWLPSEAT	VYLPPVPVSK	VVSTDEYVAR	TNIYYHAGTS	RLLAVGHPYF	PIKKPNNNKI
	61	LVPKVSGLQY	RVFRIHLDPDP	NKFGFPDTSF	YNPDTQRLVW	ACVGVEVGRG	QPLGVGISGH
	121	PLLNLDDTE	NASAYAANAG	VDNRECISMD	YKQTQLCLIG	CKPPIGEHWG	KGSPCTNVAV
	181	NPGDCPPLEL	INTVIQDGDM	VDTGFGAMDF	TTLQANKSEV	PLDICTSICK	YPDIKIMVSE
5	241	PYGDSLFFYL	RREQMFVRHL	FNRAVAVGEN	VPQLYQTCKA	TGTCPPDVIP	KVDDLYIKGS
	301	GSTANLASSN	YFPTPSGSMV	TSDAQIFNKP	YWLQRAQGHN	NGICWGNQLF	VTVDTTTRST
	361	NMSLCAAI	SETTYKNTNF	KEYLRHGEEY	DLQFIFQLCK	ITLTADVMTY	IHSMNSTILE
	421	DWNFGLQPPP	GGTLEDYRF	VTSQAIACQK	HTPPAPKEDP	LKKYTFWEVN	LKEKFSADLD
	481	QFPLGRKFLL	Q				

10

HPVchim07 (SEQ ID NO: 42)

	1	WSLWLPSEAT	VYLPPVPVSK	VVSTDEYVAR	TNIYYHAGTS	RLLAVGHPYF	PIKKPNNNKI
	61	LVPKVSGLQY	RVFRIHLDPDP	NKFGFPDTSF	YNPDTQRLVW	ACVGVEVGRG	QPLGVGISGH
	121	PLLNLDDTE	NASAYAAQLY	QTCKATGTCP	PDVIPKVNAG	VDNRECISMD	YKQTQLCLIG
	181	CKPPIGEHWG	KGSPCTNVAV	NPGDCPPLEL	INTVIQDGDM	VDTGFGAMDF	TTLQANKSEV
	241	PLDICTSICK	YPDIKIMVSE	PYGDSLFFYL	RREQMFVRHL	FNRAVAVGEN	VPDDLYIKGS
15	301	GSTANLASSN	YFPTPSGSMV	TSDAQIFNKP	YWLQRAQGHN	NGICWGNQLF	VTVDTTTRST
	361	NMSLCAAI	SETTYKNTNF	KEYLRHGEEY	DLQFIFQLCK	ITLTADVMTY	IHSMNSTILE
	421	DWNFGLQPPP	GGTLEDYRF	VTSQAIACQK	HGGLGIGTGS	GTGGRTGYVP	LTPAPKEDP
	481	LKYYTFWEVN	LKEKFSADLD	QFPLGRKFLL	Q		

20

HPVchim08 (SEQ ID NO: 43)

	1	MALWRPSDNT	VYLPPPSVAR	VVNTDDYVTR	TSIFYHAGSS	RLLTVGNPYF	RVPAGGGNKQ
	61	DIPKVSAYQY	RVFRVQLPDP	NKFGLPDINSI	YNPETQRLVW	ACVGVEIGRG	QPLGVGLSGH
	121	PFYKNLDDTE	SSHAATSQLY	QTCKATGTCP	PDVIPKVNVS	EDVRDNVSVD	YKQTQLCILG
	181	CAPAIGEHWA	KGACKSRPL	SQGDCPPLEL	KNTVLEDGDM	VDTGYGAMDF	STLQDTKCEV
	241	PLDICQSICK	YPDYLQMSAD	PYGDSMFFCL	RREQLFARHF	WNRAGTMGDT	VPPSLYIKGT
25	301	GMRASPGSCV	YSPSPSGSIV	TSDSQLFNKP	YWLHKAQGHN	NGVCWHNQLF	VTVDTTTRST

361 NLTICASTQS PVPQQYDATK FKQYSRHVEE YDLQFIFQLC TITLTADVMS YIHSMNSSIL
421 EDWNFGVPPP PTTSLVDTYR FVQSVAITCQ KDAAPAENKD PYDKLKFWNV DLKEKFSLDL
481 DQYPLGRKFL VQ

HPVchim09 (SEQ ID NO: 44)

5
1 MALWRPSDNT VYLPPPSVAR VVNTDDYVTR TSIFYHAGSS RLLTVGNPYF RVPAGGGNKQ
61 DIPKVSAYQY RVFRVQLPDP NKFGLPONSI YNPETQRLVW ACVGVEIGRG QPLGVGLSGH
121 PFYNKLDDTE SSHAATSNVS EDVRDNVSVD YKQTQLCILG CAPAIGEHW A KGTACKSRPL
181 SQGDCPPLEL KNTVLEDGDM VDTGYGAMDF STLQDTKCEV PLDICSICK YPDYLMQMSAD
241 PYGDSMFFCL RREQLFARHF WNRAGTMGDT VPPSLYIKGT GMRASPGSCV YSPSPSGSIV
301 TSDSQLFNKP YWLHKAQGHN NGVCWHNQLF VTVVDTTRST NLTICASTQS PVPQQYDATK
10 361 FRQYSRHVEE YDLQFIFQLC TITLTADVMS YIHSMNSSIL EDWNFGVPPP PTTSLVDTYR
421 FVQSVAITCQ KDQLYQTCKA TGTCPPDIVP KVAAPAENKD PYDKLKFWNV DLKEKFSLDL
481 DQYPLGRKFL VQ

HPVchim10 (SEQ ID NO: 45)

15
1 WSLWLPSEAT VYLPPVPVSK VVSTDEYVAR TNIYYHAGTS RLLAVGHPYF PIKKPNNNKI
61 LVPKVSGLQY RVFRIHLD PDP NKFGFPDTSF YNPDTQRLVW ACVGVEVGRG QPLGVGISGH
121 PLLNKLDDTE NASAYAAGGL GIGTGSGTGG RTGYVPLNAG VDNRECISMD YKQTQLCLIG
181 CKPPIGEHWG KGSPCTNVAV NPGDCPPLEL INTVIQDGDM VDTGFGAMDF TTLQANKSEV
241 PLDICTSICK YPDYIKMVSE PYGDSLFFYL RREQMFVRHL FNRAGAVGEN VPDDLIIKGS
301 GSTANLASSN YFPTPSGSMV TSDAQIFNKP YWLQRAQGHN NGICWGNQLF VTVVDTTRST
20 361 NMSLCAAIST SETTYKNTNF KEYLRHGEEY DLQFIFQLCK ITLTADVMTY IHSMNSTILE
421 DWNFGLQPPP GGTLEDYRF VTSQAIACQK HTPAPKEDP LKKYTFWEVN LKEKFSADLD
481 QFPLGRKFL Q

25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido L1 del virus de papiloma humano (HPV) tipo 18 o fragmento del mismo que comprende cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1.

2. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 1, en donde el péptido L2 es un péptido no HPV tipo 18.

3. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido es capaz de inducir una respuesta inmunitaria a una proteína natural que comprende el polipéptido L2.

4. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 3, en donde el polipéptido es capaz de inducir una respuesta inmunitaria a cuando menos una proteína L2 natural adicional.

5. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína HPV L1 comprende una supresión en el extremo C de uno o más aminoácidos.

6. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta dentro de una región expuesta del polipéptido L1.

7. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta en el lazo DE de la proteína L1.

8. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 7, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta entre los

aminoácidos 132 - 142.

9. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta en el lazo FG de la proteína L1.

5 10. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 9, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta entre los aminoácidos 172 - 182.

10 11. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta en el lazo HI de la proteína L1.

12. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 11, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta entre los aminoácidos 345 - 359.

15 13. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta dentro del extremo C del polipéptido L1.

14. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 13, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta entre los aminoácidos 429 - 445.

20 15. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende dos o más péptidos L2 insertados dentro del polipéptido L1.

16. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 15, en donde los dos o más péptidos L2 se insertan en diferentes sitios.

25 17. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 16,

en donde un primer péptido L2 se inserta en el lazo DE y un segundo péptido L2 se inserta en el extremo C del polipéptido L1.

18. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde los dos o más péptidos L2 son
5 diferentes.

19. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende cuando menos 8 aminoácidos contiguos de un polipéptido L2 natural.

10 20. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se selecciona de los aminoácidos 1 a 200 del extremo N de un polipéptido HPV L2.

15 21. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se selecciona de los aminoácidos 1-150 del extremo N de un polipéptido HPV L2.

20 22. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se selecciona del grupo seleccionado de:

un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 17-36 de un polipéptido HPV L2;

un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2;

25 un péptido que comprende los residuos de aminoácidos

96-115 de un polipéptido HPV L2; y

un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 108-120 de un polipéptido HPV L2.

23. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2
5 consiste en los aminoácidos 17-36 de L2 de HPV tipo 33.

24. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 consiste en los aminoácidos 56-75 del L2 del HPV tipo 58.

10 25. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NOs: 1-31.

15 26. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende cuando menos una inserción, supresión y/o sustitución de aminoácidos en comparación con un polipéptido L2 natural.

20 27. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 26, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende una inserción de uno o más aminoácidos en comparación con un polipéptido L2 natural.

25 28. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 26, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende una supresión de uno o más aminoácidos en comparación con un polipéptido L2 natural.

29. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 26, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende una sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con un polipéptido L2 natural.

5 30. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde la cuando menos una inserción, supresión o sustitución de aminoácidos remueve un enlace disulfuro entre dos cisteínas o remueve los aminoácidos entre dos cisteínas capaces de formar un enlace disulfuro.

10 31. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende dos o más péptidos L2.

32. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 31, en donde los dos o más péptidos L2 son contiguos.

15 33. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 31, en donde los dos o más péptidos L2 están unidos por cuando menos un aminoácido adicional.

34. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 33, en donde los dos o más péptidos L2 están unidos por un espaciador que comprende una pluralidad de aminoácidos.

20 35. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido L2 comprende cuando menos 8 aminoácidos contiguos, los cuales cuando menos 8 aminoácidos contiguos comprenden una secuencia idéntica a la de los
25 polipéptidos L2 de cuando menos dos tipos de HPV.

36. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta dentro del polipéptido L1 sin suprimir un aminoácido del polipéptido L2.

5 37. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 se inserta dentro del polipéptido L1 con la supresión de uno o más aminoácidos del polipéptido L2.

10 38. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las secuencias ID números 32-45.

15 39. Un polipéptido L1 tipo 16 de virus de papiloma humano (HPV) o fragmento del mismo que comprende un péptido que comprende los aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1.

40. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 39, en donde el péptido comprende los aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2 que se selecciona de un HPV tipo oncogénico.

20 41. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 39 o 40, en donde un péptido que comprende los aminoácidos 56-75 de un polipéptido HPV L2 tipo 58 es insertado dentro del polipéptido HPV L1.

25 42. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende cuando menos una inserción, supresión o sustitución de

aminoácidos en comparación con una secuencia natural de polipéptido L2.

43. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 42, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende una inserción
5 de uno o más aminoácidos en comparación con una secuencia de polipéptido L2.

44. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 42, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende una supresión de uno o más aminoácidos en comparación con una secuencia de
10 polipéptido L2.

45. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 42, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende una sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con una secuencia de polipéptido L2 natural.

46. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 42-45, en donde la cuando menos una inserción, supresión o sustitución de aminoácido remueve un enlace disulfuro entre dos cisteínas o remueve los aminoácidos entre dos cisteínas capaces de formar un enlace disulfuro.

47. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cuando menos un péptido L2 comprende dos o más péptidos L2.

48. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 47, en donde dos o más péptidos L2 son contiguos.

49. Un polipéptido como se reclama en la reivindicación 47,

en donde los dos o más péptidos L2 están unidos por cuando menos un aminoácido adicional.

50. El polipéptido como se reclama en la reivindicación 49, en donde los dos o más péptidos L2 están unidos por un espaciador
5 que comprende una pluralidad de aminoácidos.

51. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 42-50, en donde el polipéptido que comprende el cuando menos un péptido L2 que comprende cuando menos una inserción, supresión o sustitución de aminoácidos es capaz de inducir una respuesta
10 inmunitaria a una proteína natural que comprende el polipéptido L2.

52. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido L2 comprende cuando menos 8 aminoácidos contiguos, los cuales cuando menos 8 aminoácidos contiguos son una secuencia idéntica a la de los polipéptidos L2 de
15 cuando menos dos tipos de HPV.

53. Un capsómero que comprende un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52.

54. Una partícula parecida a virus (VLP) que comprende un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1
20 a 52.

55. Una composición inmunogénica que comprende una proteína, capsómero o VLP como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1-54 y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 56. La composición inmunogénica como se reclama en la

reivindicación 55 que además comprende un adyuvante.

57. La composición inmunogénica como se reclama en la reivindicación como se reclama en la reivindicación 56 en donde el adyuvante comprende una sal de aluminio.

5 58. La composición inmunogénica como se reclama en la reivindicación 57, en donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio.

59. La composición inmunogénica como se reclama en la reivindicación 57 o 58, que comprende adicionalmente 3D-MPL.

10 60. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 0 a 52.

61. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico como se reclama en la reivindicación 59.

15 62. Un vector de expresión como se reclama en la reivindicación 61, en donde el vector de expresión es un baculovirus recombinante.

20 63. Una célula huésped transformada con un ácido nucleico como se reclama en la reivindicación 59 o un vector como se reclama en la reivindicación 61.

64. Un polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52 para uso en medicina.

25 65. Un método para producir el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, que comprende introducir el vector de expresión de la reivindicación 61 o 62 en una célula, y replicar la

célula bajo condiciones mediante las cuales se produce el polipéptido.

66. Una composición que comprende:

(i) cuando menos una partícula parecida a virus (VLP) que comprende un polipéptido L1 de virus de papiloma humano (HPV) o fragmento del mismo; y

(ii) cuando menos un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido L1 de virus de papiloma humano (HPV) o fragmento del mismo que comprende cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido HPV L1.

67. Una composición como se reclama en la reivindicación 66, en donde la VLP de (i) consiste Del polipéptido L1 o fragmento del mismo.

68. Una composición como se reclama en la reivindicación 66 o 67, en donde el cuando al menos un polipéptido quimérico de (ii) es el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-52, el capsómero de la reivindicación 53 o la VLP de la reivindicación 54.

69. La composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 66-68, en donde las VLPS del HPV en (i) comprenden las VLPs L1 de HPV 16 y/o HPV 18.

70. La composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 66-69, en donde el cuando menos un polipéptido quimérico de (ii) comprende un polipéptido L1 de HPV 16 o fragmento del mismo y/o un polipéptido L1 de HPV 18 o fragmento

del mismo.

71. La composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 66-70, en donde el cuando menos un polipéptido quimérico de (ii) consiste en un polipéptido L1 de HPV 16 o
5 fragmento del mismo, un polipéptido L1 de HPV 18 o fragmento del mismo, o tanto un polipéptido L1 de HPV 16 o fragmento del mismo como un polipéptido L1 de HPV 18 o fragmento del mismo.

72. La composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 66-71, en donde el cuando menos un polipéptido
10 quimérico de (ii) comprende una supresión en el extremo C de uno o más aminoácidos del polipéptido L1.

73 La composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 66 a 72, en donde las VLPs de (i) comprenden tanto VLPs de HPV 16 L1 como VLPs de HPV 18 L1, y en donde los
15 polipéptidos quiméricos de (ii) comprenden cuando menos un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido L1 de HPV 16 y cuando menos un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido L1 de HPV 18.

74. La composición de acuerdo con la reivindicación 73, en
20 donde el polipéptido quimérico que comprende el polipéptido L1 de HPV 16 y el polipéptido quimérico que comprende el HPV 18 comprenden diferentes péptidos L2.

75. Una composición que comprende una combinación de dos o más polipéptidos quiméricos que comprenden un polipéptido L1 de
25 virus de papiloma humano (HPV) o fragmento del mismo que

comprende cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido L1 deHPV.

76. Una composición como se reclama en la reivindicación 75, en donde los polipéptidos quiméricos son como se reclama en
5 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52.

77. La composición como se reclama en las reivindicaciones 75 o 76, en donde los polipéptidos quiméricos comprenden polipéptidos L1 del mismo tipo de HPV y los péptidos L2 son diferentes.

10 78. La composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 66 a 77, en donde cada VLP y/o polipéptido quimérico está presente en una cantidad entre 10 y 50 microgramos por dosis humana.

79. La composición como se reclama en la reivindicación 78,
15 en donde cada VLP y/o polipéptido quimérico está presente en una cantidad de aproximadamente 20 microgramos.

80. Una composición inmunogénica como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 66 a 79, que además comprende un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 81. Una composición inmunogénica como se reclama en la reivindicación 80, que además comprende un adyuvante.

82. La composición inmunogénica como se reclama en la reivindicación 81 en donde el adyuvante comprende una sal de aluminio.

25 83. La composición inmunogénica como se reclama en la

reivindicación 82 en donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio.

84. La composición inmunogénica como se reclama en la reivindicación 82 u 83, que adicionalmente comprende 3D-MPL.

5 85. Un método para preparar una composición inmunogénica, comprendiendo el método combinar

(i) cuando menos una partícula parecida a virus L1 del virus de papiloma humano (HPV) con

(ii) cuando menos un polipéptido quimérico que
10 comprende un polipéptido L1 de virus de papiloma humano (HPV) o fragmento del mismo que comprende cuando menos un péptido que comprende un epítipo de un polipéptido L2 insertado dentro del polipéptido L1 de virus de papiloma humano, y

(iii) un diluyente o vehículo farmacéuticamente
15 aceptable y opcionalmente

(iv) un adyuvante, para producir la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 84.

86. Un método para inducir anticuerpos contra el HPV en
20 humanos que comprende administrar a un humano una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59 o 66 a 84.

87. El método de la reivindicación 86, en donde inducir los anticuerpos contra el virus de papiloma humano previene, mejora o
25 trata la infección o la enfermedad por HPV.

88. Una composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59 o 66 a 84 para su uso en la prevención, mejoramiento o tratamiento de la infección o enfermedad por HPV.

5

10

15

20

25

FIG. 1A

Un HPV16 L1 con Extremo C truncado

1	WSLWLPSEAT	VYLPPVPVSK	VVSTDEYVAR	TNIYYHAGTS	RLLAVGHPYF
51	PIKKPNNNKI	LVPKVSGLQY	RVFRIHLPDP	NGFGFPDTSF	YNPDTQRLVW
101	ACVGVEVGRG	QPLGVGISGH	PLLNKLDDTE	NASAYAANAG	VDNRECISMD
151	YKQTQLCLIG	CKPPIGEHWG	KGSPCTNVAV	NPGDCPPLEL	INTVIGDCDM
201	VDTGFGAMDF	TTLQANKSEV	PLDICTSICK	YPDYIKMVSE	PYGDSLFFYL
251	RREQMFVRHL	FNRAGAVGEN	VPDDLVIKGS	GSTANLASSN	YFPTPSGSMV
301	TSDAQIFNKP	WYLQRAQGHN	NGICWGNQLF	VTVVDTTRST	NMSLCAAIST
351	SETTYKNTNF	KEYLRHGEEY	DLQFIFQLCK	ITLTADVMTY	IHSMNSTILE
401	DWFGQLQPPP	GGTLEDTYRF	VTSQAIACQK	HTPPAPKEDP	LKKYTFWEVN
451	LKEKFSADLD	QFPLGRKFLL	Q		

FIG. 1B

Un HPV18 L1 con Extremo C truncado

1	MALWRPSDNT	VYLPPPPSVAR	VVNTDDYVTR	TSIFYHAGSS	RLLTVGNPYF
51	RVPAGGGNKQ	DIPKVSAYQY	RVFRVQLPDP	NKFGLPDNSI	YNPETQRLVW
101	ACVGVEIGRG	QPLGVGLSGH	PFYNKLDDTE	SSHAATSNVS	EDVRDNVSVD
151	YKQTQLCILG	CAPAIGEHW	KGACKSRPL	SQGDCPPLEL	KNTVLEDGDM
201	VDTGYGAMDF	STLQDTKCEV	PLDICQSICK	YPDYLQMSAD	PYGDSMFFCL
251	RREQLFARHF	WNRAGTMGDT	VPPSLYIKGT	GMRASPGSCV	YSPSPSGSIV
301	TSDSQLFNKP	YWLHKAQGHN	NGVCWHNQLF	VTVVDTTRST	NLTICASTQS
351	PVPGQYDATK	FKQYSRHVEE	YDLQFIFQLC	TITLTADVMS	YIHSMNSSIL
401	EDWNFGVPPP	PTTSLVDTYR	FVQSVAITCQ	KDAAPAENKD	PYDKLKFWNV
451	DLKEKFSLDL	DQYPLGRKFL	VQ		

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

FIG. 2A

Lazo DE de HPV16 y -18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

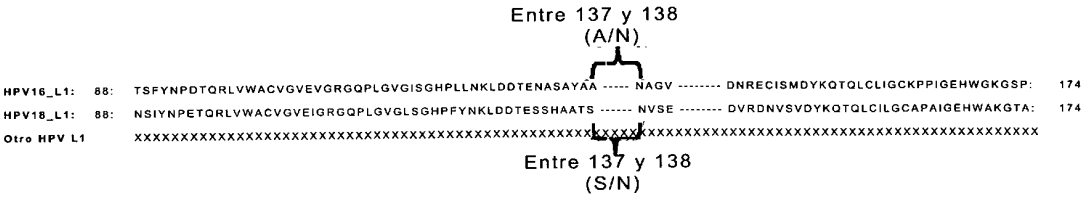


FIG. 2B

Lazo FG de HPV16 y -18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

Entre 272 y 273
(P/D)

HPV16_L1: 247: FFYLRREQMFVRHFLFNRAAGVG -- ENVP DDLYIKGS ---- GSTA -- NLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWLQRAQGHHNGICWGNQ: 328

HPV18_L1: 247: FFCRLRREQLFARHFWRNAGTMG -- DTPV PSLYIKGT ---- GMRA -- SPGSCVYSPPSGSIIVTSDQLFNKPYWLHKAQGHHNGVCWHNQ: 328

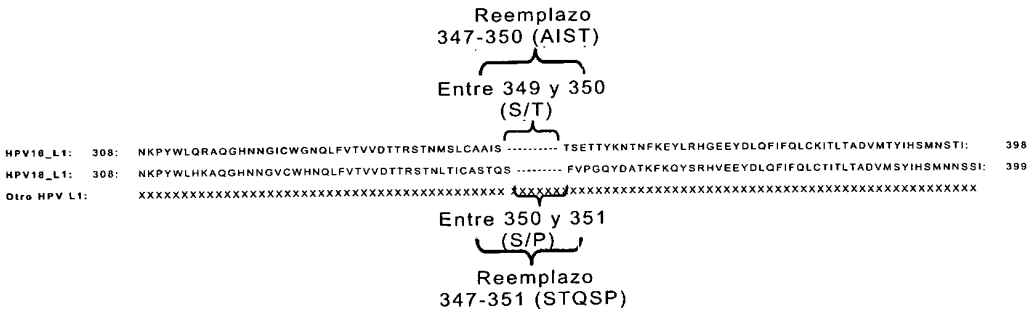
Otro HPV L1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.....XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Entre 272 y 273
(P/P)

FIG. 2C

Lazo HI de HPV16-18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

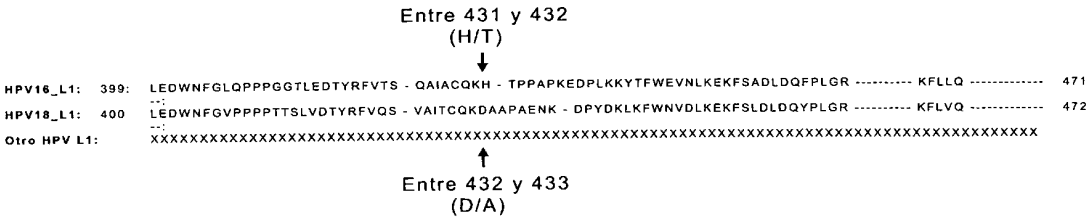


192

Figura 2D

Extremo C de HPV16-18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)



193

FIG. 3A

Lazo BC de HPV16-18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV16 L1:	1	-----MSLWLPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKKN--N-NRILVPKVSGLQYRVFRIHLEDPNKFGLPD:	87
HPV18 L1:	1	-----MALWRPSDNTVYLPPP-SVARVNTDDYVTRTSIFIHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	87
HPV31 L1:		-----MSLWLPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	87
HPV35 L1:		-----MSLWRSNEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	88
HPV52 L1:		VNVFHFILQNSVMRPSATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	87
HPV33 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	116
HPV58 L1:		VNVFHFILQNSVMRPSATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	88
HPV67 L1:		VNVFHFILQNSVMRPSATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	114
HPV34 L1:		VNVCHIF--LQNRRTTEAKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	117
HPV54 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	112
HPV11 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	86
HPV13 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	84
HPV68 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	84
HPV16 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	84
HPV42 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	84
HPV10 L1:		VNVSHIFLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	115
HPV55 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	84
HPV28 L1:		-----MALWRSNDNLVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	85
HPV30 L1:		VNVSHIFLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	115
HPV40 L1:		-----MSVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVSTSIYYTAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	85
HPV29 L1:		-----MALWRSNDNLVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	85
HPV44 L1:		VNVSTISLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	102
HPV27 L1:		VNVSTISLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	102
HPV57 L1:		VNVCTISLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	196
HPV24 L1:		VNVCTISLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	103
HPV26 L1:		VNVCTISLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	102
HPV43 L1:		VNVCTISLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	86
HPV45 L1:		VNVCTISLQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	113
HPV30 L1:		-----MFPFIFLQMAVVRPSETKVLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	85
HPV53 L1:		-----MAVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	114
HPV45 L1:		-----MAVWRPSEATVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	86
HPV51 L1:		-----MALWRTNSDKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	86
HPV65 L1:		-----MALWRTNSDKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	89
HPV61 L1:		-----MALWRTNSDKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	86
HPV62 L1:		-----MALWRTNSDKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	121
HPV39 L1:		VNVFHFILQMALWRPSDNTVYLPPP-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	87
HPV70 L1:		-----MALWRTNSDKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	87
HPV69 L1:		-----MALWRTNSDKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	87
HPV38 L1:		-----MTLWLPASGKILPPTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	85
HPV20 L1:		-----MALWRTNSDKVYLPPV-PVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	88
HPV14 L1:		-----MAVWQAASGKVLPPSTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	88
HPV21 L1:		-----MAVWQAASGKVLPPSTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	88
HPV25 L1:		-----MAVWQAASGKVLPPSTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	88
HPV63 L1:		-----MAVWQAASGKVLPPSTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	87
HPV17 L1:		-----MTLWLPASGKVLPPSTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	89
HPV19 L1:		VNIYNFLLQMAVWQAASGKVLPPSTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	117
HPV09 L1:		-----MSLWLPASGKVLPPSTFVARVQSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLTVGHPYF--VPAG--GQKQDIPKVSAYQYRVFVRLPDNKFGLPD:	89

hdy

FIG. 3C

Lazo DE de HPV16 y 18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV16_L1	88	:	TSFYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTENASAYAA-----NAGV-----DNRECSIMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKQCP	174
HPV18_L1	88	:	NSIYNPETORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTESSHAATS-----NVSE-----DVRNVSVDYKQTQLCLIGCAPIGEHWAKGTA	174
HPV31_L1		:	TSFYNPETORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTENSRYAG-----GPGT-----DNRECSIMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKQSP	175
HPV35_L1		:	TSEYDPAORLVWACTGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTENSRYVG-----NSGT-----DNRECSIMDYKQTQLCLIGCRPPIGEHWGKQTF	174
HPV52_L1		:	TSFYNPETORLVWACTGLEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTETSNNRYAG-----KPGI-----DNRECSIMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKQTP	203
HPV33_L1		:	TSFYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTETSNNRYPA-----QPGA-----DNRECSIMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKQVA	175
HPV50_L1		:	TSFYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTETSNNRYPA-----QPGS-----DNRECSIMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKQVA	201
HPV67_L1		:	TSFYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTETSNNRYPS-----QPCF-----DNRECSIMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKQPP	204
HPV34_L1		:	ASFYNPDKERLVWACAGVEVGRGQPLGIGTSGNPNHNKLEDTENAAKYIG-----GNIA-----DSRECMVDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKQTP	199
HPV32_L1		:	TNLYNPETQRHVWACVGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTENAPRYAG-----QPGT-----DNRENVSMYKQTQLCLIGCTPPIGEHWAKGTA	173
HPV54_L1		:	PSLYNPETORLVWACTGVVEVGRGQPLGVGISGRHPLLNKLDOTENAPRYVG-----AGA-----DNRENVSMYKQTQLCLIGCTPPIGEHWAKGNL	170
HPV11_L1		:	SSLFDPTTORLVWACTGLEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNGYGG-----NPGQ-----DNRVNVGMDYKQTQLCLIGCVGAPPIGEHWGKQTO	171
HPV13_L1		:	TSIFDSTSORLVWACTGLEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNGYAA-----NPGQ-----DNRVNVGMDYKQTQLCLIGCVGAPPIGEHWGKQTO	171
HPV6A_L1		:	SSLFDPTTORLVWACTGLEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNGYGG-----NPGQ-----DNRVNVGMDYKQTQLCLIGCVGAPPIGEHWGKQTO	171
HPV10_L1		:	TNLYNPETQRHVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENAPTYGG-----GPGT-----DNRENVSMYKQTQLCLIGCVGAPPIGEHWGKQTA	173
HPV42_L1		:	ARIYNPDAERLVWACTGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----PIGQ-----DSRDNISVDKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	202
HPV55_L1		:	TSIYDPTTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----SPGQ-----DNRVNVGMDYKQTQLCLIGCVGAPPIGEHWGKQTP	171
HPV28_L1		:	ARIYNPDAERLVWACTGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----DIQV-----DSRDNISVDKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	174
HPV03_L1		:	ARIYNPDAERLVWACTGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----DIQV-----DSRDNISVDKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	202
HPV07_L1		:	TSIFNSETORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VPGQ-----DNRVNVGMDYKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	172
HPV40_L1		:	TSIFNSETORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----GPGQ-----DNRVNVGMDYKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	172
HPV29_L1		:	ARIYNPDAERLVWACTGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----ENGO-----DSRDNISVDKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	174
HPV44_L1		:	TSIYDPTTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----GPGQ-----DNRVNVGMDYKQTQLCLIGCVGAPPIGEHWGKQTO	171
HPV27_L1		:	ADLYDPTTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----AE-----DGRNISM DYKQTQLCLIGCRPPIGEHWGKQTP	281
HPV59_L1		:	ADLYDPTTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----AD-----DGRNISM DYKQTQLCLIGCRPPIGEHWGKQTP	188
HPV26_L1		:	ADLYDPTTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----AD-----DGRNISM DYKQTQLCLIGCRPPIGEHWGKQTP	187
HPV43_L1		:	ADLYDPTTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----AD-----DGRNISM DYKQTQLCLIGCRPPIGEHWGKQTP	173
HPV25_L1		:	ADLYDPTTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----AD-----DGRNISM DYKQTQLCLIGCRPPIGEHWGKQTP	200
HPV30_L1		:	TNLYNPDAERLVWACTGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----DTAE-----DSRDNISVDKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	181
HPV53_L1		:	TNLYNPDAERLVWACTGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----DTAE-----DSRDNISVDKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	172
HPV33_L1		:	TNLYNPDAERLVWACTGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----DTAE-----DSRDNISVDKQTQLCLIGCTPPIGEHWGKQTP	201
HPV45_L1		:	STLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	173
HPV51_L1		:	PNLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	173
HPV66_L1		:	PSFYNPDAERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	173
HPV61_L1		:	GTLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	208
HPV62_L1		:	ATLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	173
HPV39_L1		:	ASLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	173
HPV70_L1		:	PSLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	173
HPV69_L1		:	PSLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	173
HPV68_L1		:	STLYNPDTORLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	172
HPV38_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	174
HPV20_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	176
HPV14_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	174
HPV21_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	175
HPV25_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	174
HPV63_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	203
HPV17_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	174
HPV19_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	174
HPV09_L1		:	MSVYNPDKERLVWACVGVVEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKLDOTENSNIANG-----VITQ-----DNRNVSVDYKQTQLCLIGCVPAIGEHWAKGTA	174

464

FIG. 3D

Lazo DE de HPV16 y 18 L1 (continuación)

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV08_L1	:	MSVYNPDKERLWVWACRGLEISRGGPLGVGSGTGHPYFNKKVKDTENSNSYTT-----TSTD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWEKAIP:	174
HPV19_L1	:	MSVNPKEKRLVWACFGLIEIRGQPLGVGTSGHPLFNKKVKDTENNSNYQG-----NSTD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDRLV:	174
HPV1A_L1	:	KAIFFNPETERLVWGLRGIEIRGGPLGIGITGHPFLNKLDDAENPTNITM-----THANG-----DSRONIAFDPAKQIQMFIVGCTPASGEHWTSSR:	178
HPV63_L1	:	NGFYDSHERLVWKLRLGIEIRGGPLGIGITGHPFLNKKVKDTENANNYIV-----TSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	175
KPV45_L1	:	NWITNPEKERLVWACRGLEIRGQPLGVGTTGHPLENKLRDTENNSNYQG-----GSRD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV37_L1	:	MSVYNPEKERLVWACAGLEIRGQPLGVGTTGHPLENKLRDTENNSNYQG-----GSRD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	175
HPV04_L1	:	NGFYDSHERLVWKLRLGIEIRGGPLGIGITGHPFLNKKVKDTENNSNYQG-----GSRD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV24_L1	:	MSVYNPEKERLVWGCROVETIRGQPLGVGTSGHPLFNKKVKDTENNSYATQ---ASTD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	176
HPV12_L1	:	MSVYNPDRERLVWACRGLEISRGGPLGVGSGTGHPYFNKKVKDTENNSNYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV23_L1	:	MTIYDPDKYRLVWACAGLEIRGQPLGVGSGTGHPLENKLRDAENSSERQE-----GTVD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV05_L1	:	MSVYNPDKERLVWACRGLEIRGQPLGVGSGTGHPYFNKKVKDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV47_L1	:	MSVYNPDKERLVWACRGLEIRGQPLGVGSGTGHPYFNKKVKDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV22_L1	:	MTIHDPERYRLVWACKGLEIRGQPLGVGTTGHPLENKLRDTENPTERQE-----GTSK-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV36_L1	:	MSVYNPDKERLVWACRGLEIRGQPLGVGSGTGHPLENKLRDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV38_L1	:	MSVYNPDKERLVWACRGLEIRGQPLGVGSGTGHPLENKLRDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	174
HPV60_L1	:	RAVFNPEKERLVWALGLEIRGGPLGIGITGHPLENKLRDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	183
HPV48_L1	:	KNLYNSDKERLVWKLVLGVGGRGGPLGVGSGTGHPLENKLRDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	177
HPV50_L1	:	TTLYNSDTERLVWKLVLGVGGRGGPLGVGSGTGHPLENKLRDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	173
HPV41_L1	:	KSLFNPKERLVWGLRGIEVSRGQPLGIGITGHPFNKKVKDTENNSYAT-----GSKD-----DRQNTSFDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEP:	199

497

FIG. 3E

Lazo EF de HPV16 y 18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV16_L1:	149	:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGSFCTN--VAVNFGDCPFLELINTVIOQDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV18_L1:	149	:	VDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTACKS--RPISGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFSTLQDCKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV31_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGSFCSN--NAITFGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFSTLQDCKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV35_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTFCNA--NQVKGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV52_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTFCNN--NSGNFGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV33_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTACT--NAAPANDCPFLELINTVIEDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV68_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTACN--NNAATDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV67_L1:		:	MDAKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTFCSC--NSNGPGACPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV34_L1:		:	VDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTFCG--TQVAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV32_L1:		:	MDCKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTACSA--QSMGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV54_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTNCTP--NTLAAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV11_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTQCSN--TSVQNGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV13_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTQCTG--VNVFGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV69_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTQCTN--TPVQAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV6A_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTQCTN--TPVQAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV42_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTACTP--QSMGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV10_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTFCR--NPAQAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV55_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWKGTFCNN--QSVNFGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV28_L1:		:	LDNKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTFCR--QNTQAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV03_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTFCR--QNASFGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV07_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTFCNA--QVSGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV40_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTFCNA--SRVTGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV29_L1:		:	VDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTVCAR--TSSAAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV44_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTQCN--VSVAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV27_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV37_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV2A_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV26_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV43_L1:		:	MDYKQTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV30_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV53_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV45_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV51_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV66_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV61_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV56_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV62_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV39_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV70_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV65_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV68_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV19_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246
HPV09_L1:		:	VDNKTQLCLIGCTPFPMGEHWKGTTCNG--SS--AAGDCPFLELKNVTLEDDGMVDITGFGAMDFHTLQANKSEVPDLICTSICKYPDYIKMVSSEPYGDSL:	246

FIG. 3F

Lazo EF de HPV16 y 18 L1 (continuación)

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV08_L1 : FDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWEKAIPCAED-O-QO-GLCPPIELKNTVIEDGDMADIGFGNNMFKTLQONRSQVSLDIVNEICKYPDFLKMQNDVIGDAC: 245
HPV16_L1 : FDPKQVQMEFVVGCVPCLGEHNDALVCESE-RNNQAGKCPPIELKNTVIEDGDMEDIGFGNINNKALSVTKSDVSLDIVNETCKYPDFLTMANDVIGDAC: 247
HPV1A_L1 : FDAKQTQMFIVGCTPASGEHMTSSR-CPGE--QVRLGDCPRVQMISSVIEDGDMMDIGFGAMDFALQDDKSDVFLUVVQIACKYFDYLRMNEATYQWSH: 250
HPV65_L1 : LDFKQTQMFIIIGCTPAIGEHWDKAEPCASE-V-PQGGDCPPIELVNTYIEDGDMCDIGFGAFNEKALQDDKSSAPLDVIATVCKMPOFLKMGKDIYGDSL: 247
HPV49_L1 : FDPKQVQMFIIIGCTPCMGEYWDAAKPCDAD-A--GGKCPPIELKNGVIEDGDMIDIGFGNINNKTLSEVNRSDVSLDIVNEICKYPDFLKMNDIYGDAC: 247
HPV37_L1 : FDPKQVQMEFVVGCVPCMGEHWDKAPVCASE-ENNQTGQCPPIELKNTVIEDGDMFDIGFGNINNKVLSVTKSDVSLDIVNEICKYPDFLTMANDVIGDAC: 247
HPV04_L1 : LDFKQTQMFIIIGCTPAIGEHWDKAEPFCSP-A-PQGGDCPPIELVNTYIEDGDMCDIGFGAFNEKALQDDKSSAPLDVIATVCKMPOFLKMGKDIYGDSL: 247
HPV24_L1 : FDPKQIQMFIIIGCAPCIGEHWDVAERAGD-H-NDAGRCPPPIELVNSVIEDGDMADIGVGNLFRTLQQRSDVSLDIVNETCKYPDFLKMNDVIGDSC: 248
HPV12_L1 : FDPKQIQMFIVGCTPCVGEHWEKALPCGDA-P-AENGVCPPPIELKNTFIEDGDMADIGFGNNMFKTLQONRSQVSLDIVNETCKYPDFLKMNDVIGDAC: 246
HPV23_L1 : FDPKQVQMFIIIGCTPCLGEYMDTAPVCKDA-G-SQLGLCPPIELKNSVIEDGDMFDIGFGNINNKTLSEVNRSDVSLDLVNEVCKYPDFLTMSNDVIGDAC: 246
HPV05_L1 : FDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAVPCAEN-D-QQTGLCPPIELKNTYIEDGDMADIGFGNNMFKALQDSRSQVSLDIVNETCKYPDFLKMNDVIGDAC: 246
HPV47_L1 : FDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAEPCEG---QQTGLCPPIELKNTYIEDGDMADIGFGNINFKALQHSRSQVSLDIVNETCKYPDFLKMNDVIGDAC: 244
HPV22_L1 : FDPKQVQMFIIIGCIPCLGEYWDKAPVCEDA-G-SQVGLCPPIELKNGVIEDGDMFDIGFGNINNKTLSEVNRSDVSLDIVNEICKYPDFLTMSNDVIGDSC: 246
HPV36_L1 : FDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAIPCEKE-R-QNRLCPIELKNTYIEDGDMADIGFGNINFKALQESRSQVSLDIVNETCKYPDFLKMNDVIGDAC: 246
HPV58_L1 : FDPKQIQMFIVGCTPCIGEHWDKAVPCAEN-D-QQTGLCPPIELKNTYIEDGDMADIGFGNNMFKALQDSRSQVSLDIVNETCKYPDFLKMNDVIGDAC: 255
HPV60_L1 : MDPKQHQLFIVGCKPATGERWDIAKPCD--A-PAKGSPPIKLTQSI1QDGEKSGVPLDITNEICKYPDLKMTKDIYGDAV: 248
HPV48_L1 : MDPKQSQILIVGCCPATGERWDIAKPCD--D-LENGAAPPILVNTVIEDGDMGDIIGFGAANFKLMQDRAGVPLELIDSISINPDLKMTKDIYGDSV: 243
HPV50_L1 : IDPKQTOLLIVGCKPAVGEYWDLAEPCKN-S-LNNGKCFPIQLVNTYIEDGDMGDIIGFGAANFKLMQDRAGVPLELIDSISINPDLKMTKDIYGDSV: 245
HPV41_L1 : FDPKQTOLLIVGANPAKGEYWDVAATCEWPLTRADDKCPALZLSSYIEDADMSDIGLGNLNESTLQRNKSAPLDIVDSICKYPDYLQMIERLYGDHM: 273

664

FIG. 3G

Lazo FG de HPV16 y 18 L1

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV16_L1:	247	:	FFYLRRQMFVRHLENRAGAVG--ENVP-----DOLYIKGS---GSTA--NLASSMYFFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV18_L1:	247	:	FFCLRRQQLFARHFNRRAGTMG--DTVP-----PSLYIKGT---GARA--SPGSCVYFPTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV31_L1:		:	FFYLRRQMFVRHLENRAGTGVG--EVVP-----TDLYIKGS---GSTA--TLANSTYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	329
HPV35_L1:		:	FFYLRRQMFVRHLENRAGTGVG--ETVP-----ADLYIKG---TTG--TLPSTSYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	326
HPV52_L1:		:	FFFLRRQMFVRHFFENRAGTLC--DPVP-----GDLVIQGSN--S--GNTA--TVQSSAFFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	359
HPV33_L1:		:	FFFLRRQMFVRHFFENRAGTLC--EAVP-----DOLYIKGS---GNTA--VIQSSAFFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	326
HPV58_L1:		:	FFFLRRQMFVRHFFENRAGTLC--EAVP-----DOLYIKGS---GNTA--VIQSSAFFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	354
HPV67_L1:		:	FFFLRRQMFVRHLENRAGTLC--EDVP-----TDLYIKGS---ANTS--ALQTSAFFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	358
HPV34_L1:		:	WFLRRQMFVRHLENRAGTGVG--DAIP-----DOLYIKGT---GNTA--SPSSCVYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	351
HPV54_L1:		:	FFFLRRQMFVRHLENRAGTLC--EVVP-----EDMTYIKASHGA--SGRN--NLASSIYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	329
HPV11_L1:		:	FFFLRRQMFVRHLENRAGTMG--EVP-----NDLYIKRS---SG---NLDSSIYAATPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	322
HPV13_L1:		:	FFYLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EPVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	325
HPV56_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EPVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	322
HPV42_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EPVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	324
HPV42_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EPVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	324
HPV10_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EPVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV55_L1:		:	FFYLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DAIP-----DTFLIKS---NG--GGRD--VGSAYTSPTPSGSMVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	355
HPV28_L1:		:	FFYLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DTIP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	324
HPV32_L1:		:	FFYLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DTIP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV07_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DTVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	358
HPV40_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DSVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	326
HPV29_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DKIP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	326
HPV44_L1:		:	FFYLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EAVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV03_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EAVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	324
HPV57_L1:		:	FFSLRRQMFTRHFFENRAGTGVG--DALP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	433
HPV24_L1:		:	FFSLRRQMFTRHFFENRAGTGVG--DTIP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	340
HPV26_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DAIP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	339
HPV43_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DAIP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV30_L1:		:	WFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	355
HPV53_L1:		:	WFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	357
HPV45_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DTVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	326
HPV51_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--DTVP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV66_L1:		:	WFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	327
HPV61_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	329
HPV62_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	328
HPV39_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	362
HPV70_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	329
HPV69_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	327
HPV68_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	326
HPV38_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	326
HPV20_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	337
HPV14_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	340
HPV21_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	342
HPV25_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	341
HPV65_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	333
HPV17_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	338
HPV19_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	370
HPV09_L1:		:	FFFLRRQMFARHFFENRAGTGVG--EQLP-----DOLYIKGS---NNRS--SVASSIYVHTPSGSLVTSDAQIFNKPYYMLQRAQGHNNGICWGNQ:	338

FIG. 3H

Lazo FG de HPV16 y 18 L1 (continuación)

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV08_L1 : FFYARREQCYPARHFFVRGGKTC--DDIPAA01DGGMMKNQYIFGGQDOSOK----DIGNAMYFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 339
HPV15_L1 : FFFARREQCYARHYFVRGGAVG--DALPDAAVNO--DHNFYLPAGSTOQON----NLNSTYFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 338
HPV16_L1 : FFFARREQMYTRHFFTRGGSVGDKEAVP-----QSLYLTA0AE-PTTL----ATTNYVGTSPSGSMVSSDVQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 335
HPV65_L1 : FFYGRREQLYARHFFVRAGANG--DALPEP----FEVKTDYWIIPAGEGDQNT----LGPRIYIGTSPGSLVSSDSOLFNRFPYWLQRAQGHNNGICWDNQ: 337
HPV49_L1 : FFYARREQCYPARHFFVRGGNVG--DAIPMTAVGO--DNNYILPAASQQAQN----TLGSSLYFPTVSGSLVSTDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGICW2NQ: 338
HPV37_L1 : FFFARREQCYARHYFVRGGNVG--DAIPDGTVNO--DHKYVLPKASDQOQY----LGNSTYFPTVSGSLVTSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 338
HPV04_L1 : FFFGRREQLYARHFFVRAGTMG--DALPEP----FEATSDYFIGAONQOQOYT----LGPRIYVGTSPGSLVSSDSOLFNRFPYWLQRAQGHNNGICWDNQ: 337
HPV24_L1 : FFFARR5OCYARHFFVRGGKPG--DDIPGROI DAGTYKNQFYIFAAATGOTQK----WIGNSMIFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 342
HPV12_L1 : FFFARREQCYARHFFVRGGKTC--DDIPDAQ1DGGMMKNQYIFGAGDOSOK----DIGNAMYFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 340
HPV23_L1 : FFCARREQCYARHYFVRGGVVG--DAIPDGAQQ--DHKYVLPADQ--QM----TLENSLYFPTVSGSLVTSDSOLFNRFPFWLQRAQGHNNGILWANG: 334
HPV05_L1 : FFYARREQCYPARHFFVRGGKTC--DDIPRAQIDNGTYKNQFYIFGADGQAQK----TIGNSMYFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 340
HPV47_L1 : FFYARREQCYPARHFFVRGGKTC--DDIPGAQVGNHGMKNQFYIFGATGQAQS--TIGNAMYFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 338
HPV22_L1 : FFCARREQCYARHFFVRGGLVG--DAIPDAAVGO--DHKYVLPAS--QT----ALENSTYFPTVSGSLVTSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 334
HPV36_L1 : FFYARREQCYPARHFFVRGGKTC--DDIPDARLDNGTFKNQFFIFGADGQOQK----TIGNAMYFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 340
HPV58_L1 : FFYARREQCYPARHFFVRGGKTC--DDIPGAQIDNGTYKNQFYIFGADGQAQK----TIGNAMYFPTVSGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWANG: 349
HPV60_L1 : FFEGRREQLYARHYFVRGGIDG--DSLPE-----DSGYT-LAPOTDEPQNN--LGCYSYFPTSPGSLVSSDAQLFNRPFWLQRAQGHNNGICWNGO: 333
HPV48_L1 : FFFCKREQCYARHLEFARAGQMC--EPIFN-----ENGUY-YITPDSADQNNRSSHLSGSSVYFTTSPGSLNTSSDSOLFNRFPYWLQRAQGHNNGICWNGE: 336
HPV50_L1 : FFYAKOEQLYARHLEFTHAGPIG--EPIFN-----VSGVYNYAVNPNQPEQNRRTNIGSLYFTTSPGSLNTSSDSOLFNRFPYWLQRAQGHNNGILWNGE: 360
HPV41_L1 : FFYVAREALYARHINQHAGKMDA-EQFP-----TSLYIDSSVEGSKLNS--LQRTDRIFMTSPGSLVATEQQLFNRPFWLQRAQGHNNGILWNGE: 360

FIG. 31

Lazo HI de HPV16 y 18 L1

HPV16_L1:	308	:	NKPYWLQRAQGHHNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMSLCAAIS-----TSETTYKNTNFKEYLRHGEEDLOQIFQLCKRILTADVMYTIHSMNSTI:	398
HPV18_L1:	308	:	NKPYWLHKAQGHNNQVCMHNLQFVTVVDTTRSTNHLTICASTQS-----VPFOOTATKFKQYLRHVEEDLOQIFQLCKRILTADVMYTIHSMNSSI:	399
HPV31_L1:		:	NKPYWHORAGGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMSVCAAS-----NSDSTFKSSNFKEYLRHGEEDLOQIFQLCKRILTADVMYTIHSMNPAT:	399
HPV35_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMSVCSAVS-----SSDSTYKNDNFKEYLRHGEEDLOQIFQLCKRILTADVMYTIHSMNPDI:	396
HPV52_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----JESSTYKNEFNKEYLRHGEEDLOQIFQLCKRILTADVMYTIHSMNPDI:	428
HPV33_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQVFVTVVDTTRSTNMTLCITQV-----TSDSTYKNEFNKEYLRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	397
HPV58_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQVFVTVVDTTRSTNMTLCISV-----TKEGTYKNDNFKEYLRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEIMYTIHSMNSNI:	423
HPV67_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQIFVTVVDTTRSTNMTLCSEE-----KSEATYKNEFNKEYLRHVEEDLOQIFQLCKRISLTANVMQYTIHSMNPDI:	427
HPV34_L1:		:	NKPYWLQKAAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMFVCGVGTOST-----STTAPYANSNFKEYLRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	397
HPV32_L1:		:	NKPYWLQQAQGHNNGICWGNQVFVTVVDTTRSTNMTLCASVT-----TQDSFNNSDPREYLRHVEEDLOQIFQLCKRILTADVMYTIHSMNPDI:	391
HPV54_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQVFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV11_L1:		:	NKPYWLQKAAQGHNNGICWGNHLEFVTVVDTTRSTNMTLCASVSK-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV13_L1:		:	NKPYWLQKAAQGHNNGICWGNHLEFVTVVDTTRSTNMTLCASVSK-----S--STYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV68_L1:		:	NKPYWLQKAAQGHNNGICWGNHLEFVTVVDTTRSTNMTLCASVT-----S--STYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV6A_L1:		:	NKPYWLQKAAQGHNNGICWGNHLEFVTVVDTTRSTNMTLCASVT-----S--STYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV42_L1:		:	NKPYWLQQAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCATAT-----SGDIYTAANFKEYLRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	397
HPV32_L1:		:	NKPYWLQQAQGHNNGICWGNQVFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV55_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV28_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV03_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV07_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV40_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV29_L1:		:	NKPYWLQQAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV44_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV27_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV57_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV26_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV26_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV43_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV30_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV53_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV45_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV51_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV66_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV61_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV19_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV70_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV56_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV62_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV62_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV68_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV18_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV20_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV14_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV21_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV25_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV63_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV17_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV19_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393
HPV09_L1:		:	NKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASV-----S--ATYTNSDYKEYMRHVEEDLOQIFQLCKRILTAEVMYTIHSMNPDI:	393

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

202

FIG. 3J

Lazo HI de HPV16 y 18 L1 (continuación)

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV08_L1 : NRPFWLQRAQGIHNNCILWANQMEVTVVDNTRNTNFTISVSTENG-----ELKNITDYKSTOFREYLRHVEEVEISLILOLCKIPLKADVLAQINAMHSSL: 413
HPV15_L1 : NRPFWLRAAQCHNNCILWGNQMEFITVADNTRNTNFTISVSTDG-----NAINSEYNSQNIREFLRHVEEYQLSTIILOLCKIPLKAEVLTQINAMHSGI: 409
HPV1A_L1 : NRSYWLQRCCQCHNNCICWENQLFITVGDNTRGTSLISMKNNAS-----TYSNANFNDFLRHTEEFOLSFIVQLCKVKLTPENLAYIHTMDPNI: 404
HPV65_L1 : NRPFYMLNRAQGTNNGICWDNQLFVTLVDNTRNTNFTISVKT-----EAADESYKYKAGDFKQYLARIIEEPENEFITQLCTVPLTADVMARLNVMPNI: 409
HPV49_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCICWENQLFITVADNTRNTNFTISVSTDG-----QTPTEYDSTKVREFLRHVEEVEISLILOLCKVPLEDEVLAQINAMHSGI: 409
HPV37_L1 : NRPFWLRAAQCHNNCILWGNQMEFITVADNTRNTNFTISVSTDN-----GEVTEYNSQILREYLRHVEEYQLSIILOLCKVPLKAEVLTQINAMHSGI: 409
HPV04_L1 : NRPFYMLNRAQGTNNGICWDNQLFVTLVDNTRNTNFTISVKS-----DGANDNYQYKASDFKQYLARIIEEFEMEFIFOLCKVPLTADVMARLNVMPNI: 409
HPV24_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCICWENQLFITVVDNTRNTNFTISVITENG-----KVTDINEVDANKFREYORHVEEVEISLILOLCKIPLKADVLAQINAMHPSL: 416
HPV12_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCILWANQMEFITVVDNTRNTNFTISLISDNQ-----NVHDIENYDSQKREFLRHVEEVEISLILOLCKVPLKAEVLTQINAMHSSL: 414
HPV23_L1 : NRPFWLKRAQCHNNCILWNNQMEFITVADNTRNTNFTISGVIND-----SSLEKDATKIREFTRHVEEYQLSFILOLCRIPLKAEVLTQINAMHSDI: 404
HPV05_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCILWANQMEFITVVDNTRNTNFTISVYNQAG-----ALKDVADYNADOPREYQREHVEEVEISLILOLCKVPLKAQVLAQINAMHSSL: 414
HPV47_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCILWANQMEFITVVDNTRNTNFTISVYSQAG-----DIKDIDQYNADNPREYORHVEEVEISVILOLCKVPLKAEVLAQINAMHSSL: 412
HPV22_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCILWNNQMEFITVADNTRNTNFTISVVASD-----OTTWVDADAKIREFMRHVEEYQLSFILOLCRIPLKAEVLTQINAMHSGI: 404
HPV56_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCILWANQMEFITVVDNTRNTNFTISVYNNG-----ALKDINDYTAEQFREYORHVEEVEISLILOLCKVPLKAEVLAQINAMHSSL: 414
HPV58_L1 : NRPFWLQRAQCHNNCILWANQMEFITVVDNTRNTNFTISVYNQAT-----FLKDVADYNABOPREYORHVEEVEISLILOLCKVPLKAEVLAQINAMHSSL: 423
HPV60_L1 : NRPFYMLHRAQGANNGICWGNQLFITVVDNTRNTNFTISVYK-----QAIIDNRKTKYQDFRQYLRHTEEVEVELIILCKVPLRFDVLAHLNVMPNI: 407
HPV48_L1 : NRPFWLRAQGTNNGICWENQLFITVVDNTRNTNFTISVKNKDTALTENYIDNGYKYNADFKQYLARHTEEVEELVQLCKVPLTADVLAHLNVMPRI: 412
HPV50_L1 : NRPFYMLRAQGTNNGICWGNQEVFVTVVDNTRNINFNISVKKDVNPLDPLNVASSYMYSKDQFNQYSRHTTEEVELEFIFOLCKVGLDADILAHNLVMPRI: 415
HPV41_L1 : NRPFWLQRSQCHNNCILWNNQMEFITVVDNTRNTNFTISVPEGD-----ASSYNSKEEEFLRHTTEESQLAFILQLCKVPLTADVLAHLNVMPRI: 429

203

FIG. 3K

Brazo invasor del extremo C de HPV16 y 18 L1

HPV16 L1:	399	:	LEDWNFGLQPPPGTLEDTYRFVTS-QAIAQKH-TTPAPKEDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQ-----	471
HPV18 L1:	400	:	LEDWNFGVPPPTTSLVDTYRFVTS-VAITCQKDAAPAEH-KDPPKDKFENWDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLVQ-----	472
HPV31 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-AAPKEDDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--YRARPFKFAG--	484
HPV35 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAIVCQK-SAPKEDDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LKAAPNFKAG--	481
HPV52 L1		:	LEDWQFGLTTPPSASLEDTYRFVTS-TAITCQKH-TTPKEDDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LQARPKLKR--	512
HPV33 L1		:	LEDWQFGLTTPPSASLQDTYRFVTS-QAITCQK-VPPKEDDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LKAAPKLR--	481
HPV58 L1		:	LEDWQFGLTTPPSASLQDTYRFVTS-QAITCQK-AAPKEDDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--LKAAPKLR--	507
HPV67 L1		:	LEDWQFGLTTPPSASLQDTYRFVTS-QAITCQK-SPTAKEDDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--FTAKPKLKR--	511
HPV34 L1		:	LEQWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-QPPKEDDPLKXYTFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	508
HPV32 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-QAIRCQK-VTAPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV54 L1		:	LDQWNFGLTTPPATSSLEDTYRFVTS-QAIAQKHNAPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	477
HPV11 L1		:	LEDWNFGLSPPNGTLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	479
HPV13 L1		:	LEDWNFGLSPPNGTLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	478
HPV68 L1		:	LEDWNFGLSPPNGTLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	478
HPV6A L1		:	LEDWNFGLSPPNGTLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	511
HPV42 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV10 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-QPPKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	479
HPV55 L1		:	LEQWNFGLSPPNGTLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	478
HPV28 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	478
HPV03 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	478
HPV07 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV40 L1		:	LEDWNFGLSPPNGTLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	511
HPV29 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	480
HPV44 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV27 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	479
HPV57 L1		:	LEDWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV2A L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	478
HPV26 L1		:	LEDWNFGLTTPPSGLEDTYRFVTS-QAITCQK-TPEKEDDYPKFNFTVDLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQSG--YRGRSARTG--	478
HPV43 L1		:	LEDWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV30 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV53 L1		:	LEDWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV45 L1		:	LEDWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV51 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV66 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	484
HPV61 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	484
HPV82 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	484
HPV56 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	483
HPV62 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV39 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	484
HPV70 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	483
HPV69 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV68 L1		:	LDQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV38 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV20 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV14 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV21 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV25 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV63 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV17 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV19 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482
HPV09 L1		:	LEQWNFGVAPPSTGLSDTYRFVTS-EAIRCQK-VTTPEKDDPSTDSFWEVNLKEKFSADLQDFPLGR-----KFLQAG--LRAAPKLTAV--	482

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

402

FIG. 3L

Brazo invasor del extremo C de HPV16 y 18 L1 (continuación)

HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

HPV08_L1	:	LEEWQLGEVPTPOTPIHDTYRYIDS-LATRCPOK-SPPKEKPPDYAKFNFNNVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----Q-TTV:	494
HPV15_L1	:	LEDWQLGFVPTPDNAVQDTYRYIDS-KATKCPDA-VQPKDKEDDPFGKYTFNNVOLTERRLSLDLDQYPLGR-----KFLPQAGLQ-----R-RPR:	490
HPV1A_L1	:	LEDWQLSVSQPTNPLEDQYRFLGSSLAACPEQ-APPEPQTDPYSQYKFNEVDLTERMSQLDQFFPLGR-----KFLYQSG-----MTOR:	484
HPV65_L1	:	LDNWQLNFVPPPPSGIEDQYRFIQS-RATRCPTQ-SPSTEREDPYKDLSEFNGVOLTERRFSSLSQFSLGR-----RFLYQSGLI-----MGTAK:	491
HPV49_L1	:	LENWQLGFVPTPDNPIHDTYRYLIS-QATRCPOK-QAPERKDDPYQYFNNVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----R-ASR:	490
HPV37_L1	:	LEEWQLGFVPTPDNSVHDTYRYLNS-KATKCPDA-VVEKEKEDPFANYTFNNVOLTERRLSLDLDQYPLGR-----KFLPQAGLQ-----S-RPR:	490
HPV04_L1	:	LDNWQLNFVPPPPSGIEDQYRFLOS-RATRCPTQ-TPATEKEDPYKDLSEFNNVOLTERRFSSLSQFSLGR-----RFLYQSGLI-----MGSLE:	491
HPV24_L1	:	LEEWQLGEVVPAPDNFLQSTYRYIES-LATPCPDK-VAPKRLDEDTAFYTFNNVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----A-KTS:	497
HPV12_L1	:	LEDWQLGFVPTPDNPIHDTYRYIES-LATRCPOK-NPPEKEDDPFGKYTFNNVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----Q-TTV:	495
HPV23_L1	:	LEEWQLGFVPTPDNAVDTYRYLAS-KATKCPDA-VPDQKEDDPFGKYTFNNVOLTERRLSLDLDQYPLGR-----KFLPQAGLQ-----Q-VRS:	485
HPV05_L1	:	LEDWQLGFVPTPDNPIQDTYRYIDS-LATRCPOK-NPPEKEDDPYKGLHFNDVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----Q-TTV:	495
HPV47_L1	:	LEEWQLGFVPTPDNPIQDTYRYLES-LATRCPEK-SPPKEKVDPYKGLHFNDVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----Q-TTV:	493
HPV22_L1	:	LEEWQLGFVPTPDNSVHDTYRYLOS-KATKCPDA-VPDQKEDDPFGKYTFNNVOLTERRLSLDLDQYPLGR-----KFLPQAGLQ-----R-ARA:	485
HPV36_L1	:	LEEWQLGEVPTPDNPIQDTYRYIDS-LATRCPOK-TPEKEKEDPYKGLKFNDVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----Q-TTV:	495
HPV58_L1	:	LEDWQLGEVPTPDNPIQDTYRYIDS-LATRCPOK-NPPEKEDDPYKGLHFNDVOLTERRLSLDLDQYSLGR-----KFLPQAGLQ-----H-TTV:	504
HPV60_L1	:	LEDWQLSFVEPPPPQGLEAYRYIMS-QATRCPTQ-VNTEREDPYKQTFNWLDERFSNELSQFSLGR-----RYLYQYGLL-----N----	485
HPV48_L1	:	LEEWQLAVPPAPPGIGDTYRYIKS-MATKCPA-EP-EDTDPYKAYSEFWLDMTERFSSLSQFSLGR-----KFLYQYGLL-----NG----	490
HPV50_L1	:	LENWQLAYVPPAPSGIGDTYRYLKS-DATKCPAK-DSSAEVVDPYKAYTFNNVOLTERRFSSLSQFSLGR-----KFLPQAGLQ-----K----	493
HPV41_L1	:	LEWHLAVTSPPNSVLEDHYRYILS-LATKCPSK-DADDTSTDPYKDLKFNEVDLDRMTEQDQTPGR-----KFLPQAGLQ-----QSSSN:	511

FIG. 4

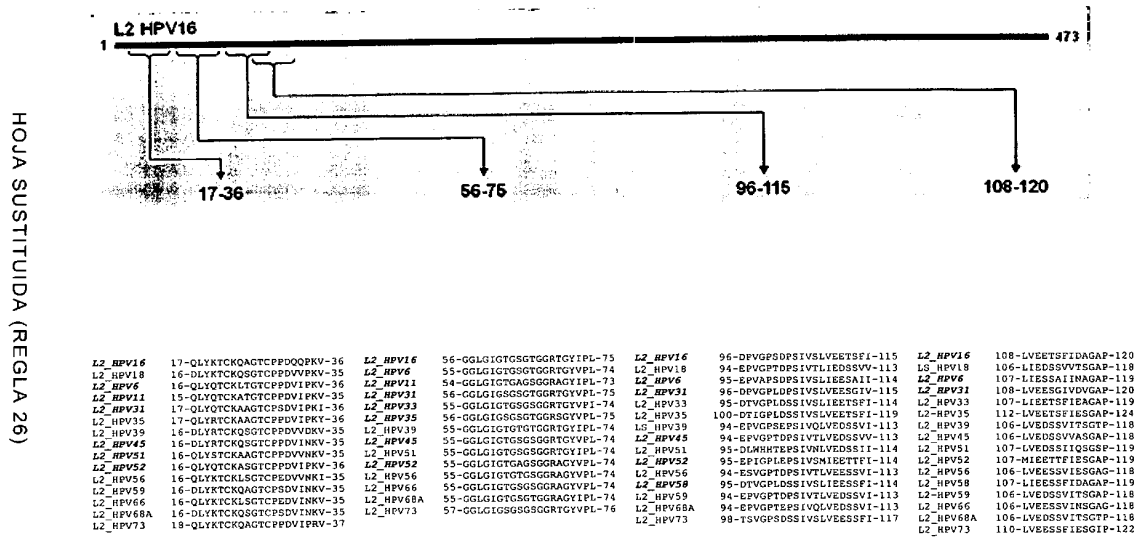
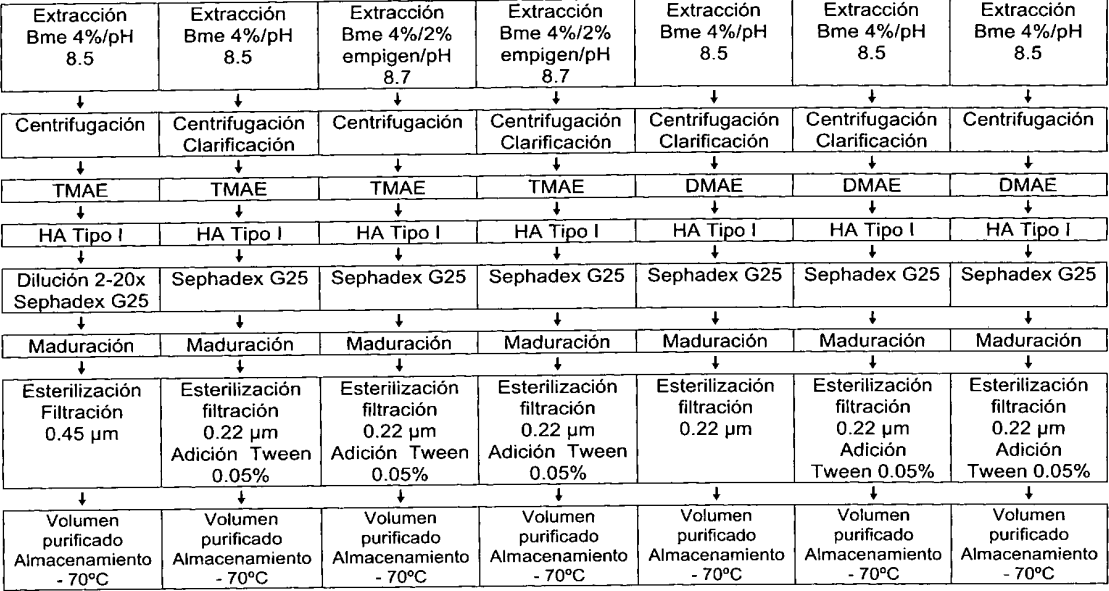


FIG. 5

Esquemas de purificación de quimeras L1/L2

Quimera # 1 Quimera # 2 Quimera # 3 Quimera # 4 Quimera # 7 Quimera # 9 Quimera # 10
Quimera # 5 Quimera # 8



HOJA SUSTITUIDA (REGLA 26)

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que solicita una patente
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art .33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resume)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes.
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que Incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación grafica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐