



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020024694-8 A2



(22) Data do Depósito: 04/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 09/03/2021

(54) Título: MUTANTE DE PROTEÍNA L1 DO TIPO 39 DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO

(51) Int. Cl.: C07K 14/025; C12N 15/11; A61K 39/12; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 04/06/2018 CN 201810563378.0.

(71) Depositante(es): XIAMEN UNIVERSITY; XIAMEN INNOVAX BIOTECH CO., LTD..

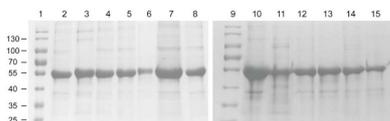
(72) Inventor(es): SHAOWEI LI; DANING WANG; ZHIPING WANG; XINLIN LIU; JUN ZHANG; NINGSHAO XIA.

(86) Pedido PCT: PCT CN2019089988 de 04/06/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/233415 de 12/12/2019

(85) Data da Fase Nacional: 03/12/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a uma proteína L1 de HPV39 mutada (ou uma variante da mesma), à sequência de codificação da mesma e a um método de preparação para a mesma, bem como uma partícula do tipo vírus compreendendo a mesma. A proteína (ou uma variante da mesma) e a partícula do tipo vírus são capazes de induzir um anticorpo de neutralização combatendo pelo menos dois tipos de HPVs (tais como HPV39 e HPV68 ou HPV39, HPV68 e HPV70), e então pode ser usada para prevenção de infecções dos pelo menos dois tipos de HPVs e doenças causadas pelas infecções, tais como câncer cervical e verruga genital. Estão também envolvidos os usos da proteína e da partícula do tipo vírus na preparação de uma composição farmacêutica ou uma vacina. A composição farmacêutica ou vacina pode ser usada para prevenção de infecções dos pelo menos dois tipos de HPVs e doenças causadas pelas infecções, tais como câncer cervical e verruga genital.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"MUTANTE DE PROTEÍNA L1 DO TIPO 39 DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO".

[0001] O presente pedido é baseado no e reivindica o benefício de prioridade do Pedido Chinês Nº. 201810563378.0, depositado em 4 de junho de 2018, cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência em suas totalidades.

Campo da Técnica

[0002] A presente invenção refere-se ao campo de virologia molecular e imunologia. Em particular, a invenção refere-se a uma proteína L1 de HPV39 mutada (ou uma variante da mesma), uma sequência codificando a mesma, um método para preparação da mesma e uma partícula do tipo vírus compreendendo a mesma, em que a proteína (ou uma variante da mesma) e a partícula do tipo vírus podem induzir a geração de anticorpos de neutralização contra pelo menos dois tipos de HPV (por exemplo, HPV39 e HPV 68 ou HPV39, HPV68 e HPV70) e, portanto, podem ser usadas para prevenir infecção pelos ditos pelo menos dois tipos de HPV, e uma doença causada pela dita infecção, tais como câncer cervical e verruga genital. A invenção refere-se ainda ao uso da proteína e da partícula do tipo vírus na fabricação de uma composição farmacêutica ou uma vacina para prevenção de infecção pelos ditos pelo menos dois tipos de HPV, e uma doença causada pela dita infecção, tais como câncer cervical e verruga genital.

Técnica Antecedente

[0003] O Papilomavírus Humano (HPV) causa principalmente verrugas na pele e mucosa. Os tipos de HPV são divididos em tipos de alto risco e tipos de baixo risco dependendo de sua associação com tumorigênese. Dentre eles, infecção por tipos de HPV de alto risco foram demonstradas ser a principal causa de câncer genital incluindo câncer

cervical em mulheres; e tipos de HPV de risco baixo causam principalmente verrugas genitais. A maneira mais eficaz de prevenir e controlar infecção por HPV é vacinar com vacinas para HPV, particularmente vacinas contra tipos de HPV de alto risco causando câncer cervical.

[0004] A proteína do capsídeo principal L1 de HPV tem a característica de automontagem em Partícula do Tipo Vírus (VLP) oca. VLP de HPV tem uma estrutura icosaédrica simétrica composta de 72 pentâmeros de proteína do capsídeo principal L1 (Doorbar, J. e P.H. Gallimore. 1987. *J. Virol.*, 61(9): 2793-9). VLP de HPV é altamente similar a HPV natural em termos de estrutura, retém a maior parte dos epítomos de neutralização de vírus natural e pode induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto (Kirnbauer, R., F. Booy e outros, 1992 *Proc Natl Acad Sci USA* 89(24): 12180-4).

[0005] No entanto, os estudos existentes mostram que VLP de HPV induzem principalmente a geração de anticorpos de neutralização contra o mesmo tipo de HPV, produzem a imunidade de proteção contra o mesmo tipo de HPV e têm apenas efeito protetor cruzado baixo dentre poucos tipos de HPV altamente homólogos (Sara L. Bissett, Giada Mattiuzzo e outros, 2014 *Vaccine*. 32:6548-6555). Portanto, as vacinas para HPV existentes têm uma faixa de proteção muito limitada. Em geral, VLP de um tipo de HPV pode ser apenas usada para prevenir infecção pelo mesmo tipo de HPV. Nesse caso, se for necessário ampliar a faixa de proteção de vacinas para HPV, a única maneira é adicionar VLPs de mais tipos de HPV em vacinas. Atualmente, as vacinas para HPV comercialmente disponíveis, incluindo Gardasil® da Merck (que é uma vacina quadrivalente contra HPV16, 18, 6 e 11), Cervarix® da GSK (que é uma vacina bivalente contra HPV16 e 18) e Gardasil® da Merck (que é uma vacina 9-valente contra HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58), são preparadas combinando VLPs de múltiplos

tipos de HPV. No entanto, tal solução aumentaria muito o custo de produção de vacinas para HPV, e causaria problema de segurança devido a um aumento em dose de imunização.

[0006] Portanto, é urgente na técnica desenvolver partículas do tipo vírus HPV capazes de induzir a geração de anticorpos de neutralização protetores contra tipos de HPV múltiplos, de modo a prevenir infecção por tipos de HPV múltiplos, e uma doença causada pela infecção, tais como câncer cervical e verruga genital, mais economicamente e efetivamente.

Conteúdos da Invenção

[0007] A presente invenção é pelo menos parcialmente baseada na constatação surpreendente do inventor: após substituição de um segmento específico de proteína L1 de Papilomavírus Humano (HPV) Tipo 39 com o segmento correspondente de proteína L1 de segundo tipo de HPV (tal como HPV68), a proteína L1 de HPV mutada então obtida pode induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV39 e o segundo tipo de HPV (tal como HPV68) em organismos, e seu efeito de proteção é comparável àquele de uma mistura de VLP HPV39 e VLP do segundo tipo de HPV, seu efeito de proteção contra HPV68 é comparável àquele de VLP HPV68 sozinho, e seu efeito de proteção contra o segundo tipo de HPV (tal como HPV68) é comparável àquele da VLP do segundo tipo de HPV sozinho.

[0008] Ainda, com base na substituição acima, um outro segmento específico de proteína L1 de HPV39 pode ser substituído ainda com o segmento correspondente de proteína L1 de um terceiro tipo de HPV (tal como HPV70), e a proteína L1 de HPV39 mutada tendo substituições duplas então obtidas pode induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV39, o segundo tipo de HPV (tal como HPV68) e o terceiro tipo de HPV (tal como HPV70); e seu efeito de proteção é comparável àquele de uma mistura de VLP de HPV39,

VLP do segundo tipo de HPV e VLP do terceiro tipo de HPV, seu efeito de proteção contra HPV39 é comparável àquele de VLP de HPV39 sozinho, seu efeito protetor contra o segundo tipo de HPV (tal como HPV68) é comparável àquele da VLP do segundo tipo de HPV sozinho e seu efeito de proteção contra o terceiro tipo de HPV (tal como HPV70) é comparável àquele da VLP do terceiro tipo de HPV sozinho.

[0009] Portanto, em um aspecto, a invenção provê uma proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma, em que comparado com a proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem, a proteína L1 de HPV39 mutada tem as mutações que seguem:

(1) truncamento N-terminal de 1-25 aminoácidos, por exemplo, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 5-15, 10-15, 10-20 ou 15-20 aminoácidos; e

(2) substituição de resíduos de aminoácidos nas posições 269-288 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um segundo tipo de HPV do tipo selvagem;

e, a variante difere da proteína L1 de HPV39 mutada apenas pela substituição (preferivelmente substituição conservativa), adição ou deleção de um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9) aminoácidos, e retém a função da proteína L1 de HPV39 mutada, isto é, capacidade de induzir geração de anticorpos de neutralização contra pelo menos dois tipos de HPV (por exemplo, HPV39 e HPV68 ou HPV39, HPV68 e HPV70).

[0010] Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV39 mutada tem ainda opcionalmente a mutação que segue:

(3) (a) substituição de resíduos de aminoácido nas posições 117-140 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem; ou

(b) substituição de resíduos de aminoácido nas posições 169-181 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem; ou

(c) substituição de resíduos de aminoácido nas posições 347-358 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem.

[0011] Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV39 mutada tem 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 ou 22 aminoácidos truncados no terminal N, comparado com a proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem. Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV39 mutada tem 15 aminoácidos truncados no terminal, comparado com a proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem.

[0012] Em algumas modalidades preferidas, o segundo tipo de HPV do tipo selvagem é HPV68. Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (2) são resíduos de aminoácido nas posições 270-289 de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem. Em algumas modalidades preferidas, o terceiro tipo de HPV do tipo selvagem é HPV70. Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (3) (a) são resíduos de aminoácido nas posições 117-141 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem. Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (3) (b) são resíduos de aminoácido nas posições 170-182 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem. Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (3) (c) são resíduos de aminoácido nas posições 348-359 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem.

[0013] Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem tem uma sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 1.

[0014] Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem tem uma sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 2.

[0015] Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem tem uma sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 3.

[0016] Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições 270-289 da proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem têm a sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 25.

[0017] Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições 117-141 da proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem têm a sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 26.

[0018] Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições 170-182 da proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem têm a sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 27.

[0019] Em algumas modalidades preferidas, os resíduos de aminoácido nas posições 348-359 da proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem têm a sequência como mostrado na SEQ ID N°: 28.

[0020] Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV39 mutada tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 10, 11 e 12.

[0021] Em um outro aspecto, a invenção provê um ácido nucleico isolado codificando a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma como acima descrito. Em um outro aspecto, a invenção provê

um vetor compreendendo o ácido nucleico isolado. Em algumas modalidades preferidas, o ácido nucleico isolado de acordo com a invenção tem uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em SEQ ID N°: 19, 22, 23 e 24.

[0022] Vetores úteis para inserção de um polinucleotídeo de interesse são bem conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitado a, vetores de clonagem e vetores de expressão. Em uma modalidade, os vetores são, por exemplo, plasmídeos, cosmídeos, fagos, etc.

[0023] Em um outro aspecto, a invenção refere-se ainda a uma célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico isolado ou o vetor. A célula hospedeira inclui, mas não está limitada a, células procarióticas, tais como células de *E. coli*, e células eucarióticas tais, como células de levedura, células de inseto, células de plantas e células de animais (tais como células de mamífero, por exemplo, células de camundongo, células de humano, etc.). A célula hospedeira de acordo com a invenção também pode ser uma linhagem celular, tal como célula 293T e célula 293TT.

[0024] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma partícula do tipo vírus HPV, a qual compreende ou consiste na proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma de acordo com a invenção.

[0025] Em algumas modalidades preferidas, a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção compreende a proteína L1 de HPV39 mutada, a qual tem truncamento N-terminal de 1-25 aminoácidos, por exemplo, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 5-15, 10-15, 10-20 ou 15-20 aminoácidos, por exemplo, 3, 5, 8, 11, 13, 15, 18, 20 ou 22 aminoácidos, comparado com uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem, e substituição dos resíduos de aminoácido nas posições 269-288 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido nas posições 270-289 da proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem.

[0026] Em algumas modalidades preferidas, a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção compreende a proteína L1 de HPV39 mutada, a qual tem truncamento N-terminal de 1-25 aminoácidos, por exemplo, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 5-15, 10-15, 10-20 ou 15-20 aminoácidos, por exemplo, 3, 5, 8, 11, 13, 15, 18, 20 ou 22 aminoácidos, comparado com uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem, e substituição dos resíduos de aminoácidos nas posições 269-288 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido nas posições 270-289 de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, e substituição dos resíduos de aminoácido nas posições 117-140 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido nas posições 117-141 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem.

[0027] Em algumas modalidades preferidas, a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção compreende a proteína L1 de HPV39 mutada, a qual tem truncamento N-terminal e 1-25 aminoácidos, por exemplo, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 5-15, 10-15, 10-20 ou 15-20 aminoácidos, por exemplo, 3, 5, 8, 11, 13, 15, 18, 20 ou 22 aminoácidos, comparado com uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem, e substituição dos resíduos de aminoácido nas posições 269-288 de uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido nas posições 270-289 de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem e substituição dos resíduos de aminoácido nas posições 169-181 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido nas posições 170-182 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem.

[0028] Em algumas modalidades, preferidas, a partícula do tipo vírus HPC de acordo com a invenção compreende a proteína L1 de HPV39 mutada, a qual tem truncamento N-terminal de 1-25 aminoácidos, por exemplo, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 5-15, 10-15, 10-20 ou 15-20 aminoácidos, por exemplo, 3, 5, 8, 11, 13, 15, 18, 20 ou 22 aminoácidos, comparado com uma proteína L1 de HPV39 do tipo

selvagem, e substituição dos resíduos de aminoácido nas posições 269-288 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido nas posições 270-289 de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, e substituição dos resíduos de aminoácido nas posições 347-358 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido nas posições 348-359 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem.

[0029] Em uma modalidade particularmente preferida, a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção compreende a proteína L1 de HPV39 mutada, a qual tem uma sequência como mostrado na SEQ ID Nº: 7, 10, 11 ou 12.

[0030] Em um outro aspecto, a invenção refere-se ainda a uma composição compreendendo a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma, o ácido nucleico isolado, o vetor, a célula hospedeira ou a partícula do tipo vírus HPV. Em algumas modalidades preferidas, a composição compreende a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma de acordo com a invenção. Em algumas modalidades preferidas, a composição compreende a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção.

[0031] Em um outro aspecto, a invenção refere-se ainda a uma composição farmacêutica ou vacina, a qual compreende a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção, e opcionalmente um veículo e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica ou vacina de acordo com a invenção pode ser usada para prevenção de infecção por HPV, ou uma doença causada por infecção por HPV, tal como câncer cervical e verrugas genitais.

[0032] Em algumas modalidades preferidas, a partícula do tipo vírus HPV está presente em uma quantidade eficaz para prevenir infecção por HPV ou uma doença causada por infecção por HPV. Em algumas modalidades preferidas, a infecção por HPV é infecção por um ou mais

tipos de HPV (por exemplo, infecção por HPV39, infecção por HPV68 e/ou infecção por HPV70). Em algumas modalidades preferidas, a doença causada por infecção por HPV é selecionada do grupo consistindo em câncer cervical e verruga genital.

[0033] A composição farmacêutica ou vacina de acordo com a invenção pode ser administrada através de métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, mas não limitado a, oralmente ou através de injeção. Na invenção, uma via de administração particularmente preferida é injeção.

[0034] Em algumas modalidades preferidas, a composição farmacêutica ou vacina de acordo com a invenção é administrada em uma forma de uma dosagem unitária. Por exemplo, mas não para limitação da invenção, cada dosagem unitária contém 5 µg-80 µg, preferivelmente 20 µg-40 µg de partícula do tipo vírus HPV.

[0035] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método para preparação da proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma como descrito acima, o qual compreende expressar a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma em uma célula hospedeira, e então recuperar a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma a partir de uma cultura da célula hospedeira.

[0036] Em algumas modalidades preferidas, a célula hospedeira é *E. coli*.

[0037] Em algumas modalidades preferidas, o método compreende as etapas de: expressar a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma em *E. coli*, e então obter a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma através da purificação de um sobrenadante de lisato da *E. coli*. Em algumas modalidades preferidas, a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma é recuperada do sobrenadante de lisato da *E. coli* através de cromatografia (por exemplo, cromatografia de troca catiônica,

cromatografia de hidroxapatita e/ou cromatografia de interação hidrofóbica).

[0038] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método de preparação de uma vacina, o qual compreende combinar a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção com um veículo e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0039] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método para prevenção de infecção por HPV ou uma doença causada por infecção por HPV, o qual compreende administrar a um indivíduo uma quantidade profilaticamente eficaz da partícula do tipo vírus HPV ou a composição farmacêutica ou vacina de acordo com a invenção. Em uma modalidade preferida, a infecção por HPV é infecção por um ou mais tipos de HPV (por exemplo, infecção por HPV39, infecção por HPV68 e/ou infecção por HPV70). Em uma outra modalidade preferida, a doença causada por infecção por HPV inclui, mas não está limitada a, câncer cervical e verruga genital. Em uma outra modalidade preferida, o indivíduo é mamífero, tal como humano.

[0040] Em um outro aspecto, a invenção refere-se ainda ao uso da proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma ou da partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção na fabricação de uma composição farmacêutica ou vacina para prevenção de infecção por HPV ou uma doença causada por infecção por HPV. Em uma modalidade preferida, a infecção por HPV é infecção por um ou mais tipos de HPV (por exemplo, infecção por HPV39, infecção por HPV68 e/ou infecção por HPV70). Em uma outra modalidade preferida, a doença causada por infecção por HPV inclui, mas não está limitada a, câncer cervical e verruga genital.

[0041] Em um outro aspecto, a invenção refere-se ainda à proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma ou à partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção para a prevenção de infecção por

HPV ou uma doença causada por infecção por HPV. Em uma modalidade preferida, a infecção por HPV é infecção por um ou mais tipos de HPV (por exemplo, infecção por HPV39, infecção por HPV68 e/ou infecção por HPV70). Em uma outra modalidade preferida, a doença causada por infecção por HPV inclui, mas não está limitada a, câncer cervical e verruga genital.

Definições de termos na presente invenção

[0042] Na invenção, a menos que de outro modo especificado, os termos técnicos e científicos usados aqui têm os significados geralmente compreendidos por um versado na técnica. Além disso, as operações de laboratório de cultura celular, genética molecular, química de ácido nucleico e imunologia usadas aqui são operações de rotina usadas amplamente nos campos correspondentes. Entretanto, a fim de compreender melhor a invenção, as definições e explicações dos termos relevantes são providas como segue.

[0043] De acordo com a invenção, o termo "um segundo tipo de HPV do tipo selvagem" se refere a um tipo de HPV do tipo selvagem diferente do HPV39. Na invenção, um segundo tipo de HPV do tipo selvagem é preferivelmente HPV68 do tipo selvagem.

[0044] De acordo com a invenção, o termo "um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem" se refere a um tipo de HPV do tipo selvagem diferente de HPV39 e o segundo tipo de HPV do tipo selvagem. Na invenção, um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem é preferivelmente HPV70 do tipo selvagem.

[0045] De acordo com a invenção, a expressão "posições correspondentes" se refere às posições equivalentes das sequências sendo comparadas quando as sequências são otimamente alinhadas, isto é, as sequências são alinhadas para obter uma porcentagem alta de identidade.

[0046] De acordo com a invenção, o termo "proteína L1 de HPV39

do tipo selvagem" se refere à proteína L1 do capsídeo principal de ocorrência natural em Papilomavírus Humano Tipo 39 (HPV39). A sequência da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem é bem conhecida na técnica, e pode ser encontrada em bancos de dados públicos (tais como Nos. de Acesso P24838.1, ARQ82617.1, AGU90549.1 e AEP23084.1 nos bancos de dados NCBI).

[0047] Na invenção, quando uma sequência de aminoácido de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem é mencionada, ela é descrita com referência à sequência como mostrado na SEQ ID N°: 1. Por exemplo, a expressão "resíduos de aminoácido nas posições 53-61 de uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem" se refere a resíduos de aminoácido nas posições 53-61 do polipeptídeo como mostrado na SEQ ID N°: 1. No entanto, um versado na técnica compreende que HPV39 do tipo selvagem pode incluir vários isolados, e pode haver diferença na sequência de aminoácido da proteína L1 dentre vários isolados. Ainda, um versado na técnica compreende que embora possa haver diferença em sequência, as sequências de aminoácido da proteína L1 têm uma identidade muito alta (geralmente maior do que 95%, por exemplo, maior do que 96%, maior do que 97%, maior do que 98% ou maior do que 99%) dentre diferentes isolados de HPV39, e têm substancialmente a mesma função biológica. Portanto, na invenção, o termo "proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem" inclui não apenas as proteínas como mostrado na SEQ ID N°: 1, mas também proteína L1 de vários isolados de HPV39 (tal como proteína L1 de HPV39 como mostrado nos Nos. P24838.1, ARQ82617.1, AGU90549.1 e AEP23084.1). Além disso, quando um fragmento de sequência de uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem é descrito, ele inclui não apenas o fragmento de sequência de SEQ ID N°: 1, mas também o fragmento de sequência correspondente de uma proteína L1 de vários isolados de HPV39. Por exemplo, a expressão "resíduos de aminoácidos nas posições

53-61 de uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem" inclui os resíduos de aminoácido nas posições 53-61 de SEQ ID N°: 1, e o fragmento correspondente de uma proteína L1 de vários isolados de HPV39.

[0048] De acordo com a invenção, o termo "proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem" se refere à proteína do capsídeo principal de ocorrência natural L1 em um Tipo 68 de Papilomavírus Humano (HPV68). A sequência de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem é bem conhecida na técnica, e pode ser encontrada em bancos de dados públicos (tais como números de acesso AAZ39498.1, AGU90717.1, P4669.1 e AGU90703.1 no banco de dados NCBI).

[0049] Na invenção, quando uma sequência de aminoácido de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem é mencionada, ela é descrita com referência à sequência mostrada na SEQ ID N°: 2. Por exemplo, a expressão "resíduos de aminoácido nas posições 53-61 de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem" se refere aos resíduos de aminoácidos nas posições 53-61 do polipeptídeo como mostrado na SEQ ID N°: 2. No entanto, um versado na técnica compreende que HPV 68 do tipo selvagem pode incluir vários isolados, e pode haver diferença na sequência de aminoácido de proteína L1 dentre vários isolados. Ainda, um versado na técnica compreende que embora possa haver diferença em sequência, as sequências de aminoácido da proteína L1 têm uma identidade muito alta (geralmente maior do que 95%, por exemplo, maior do que 96%, maior do que 97%, maior do que 98% ou maior do que 99%) dentre isolados de HPV68 diferentes, e têm substancialmente a mesma função biológica. Portanto, na invenção, o termo "proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem" inclui não apenas a proteína como mostrado na SEQ ID N°: 2, mas também proteína L1 de vários isolados de HPV68 (tal como proteína L1 de HPV68 como mostrado em AAZ39498.1, AGU90717.1, P4669.1 e AGU90703.1).

Além disso, quando um fragmento de sequência de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem é descrito, ele inclui não apenas o fragmento de sequência de SEQ ID N°: 2, mas também o fragmento de sequência correspondentes de uma proteína L1 de vários isolados de HPV68. Por exemplo, a expressão "resíduos de aminoácido nas posições 53-61 de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem" inclui os resíduos de aminoácido nas posições 53-61 de SEQ ID N°: 2 e o fragmento correspondente de uma proteína L1 de vários isolados de HPV68.

[0050] De acordo com a invenção, o termo "proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem" se refere à proteína do capsídeo L1 principal de ocorrência natural em Tipo 70 de Papilomavírus Humano (HPV70). A sequência de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem é bem conhecida na técnica, e pode ser encontrada em bancos de dados públicos (tais como Nos. de Acesso AGU90846.1, AGU90854.1, AAC54879.1 e P50793.1 em bancos de dados NCBI).

[0051] Na invenção, quando uma sequência de aminoácido de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem é mencionada, ela é descrita com referência à sequência como mostrado na SEQ ID N°: 3. Por exemplo, a expressão "resíduos de aminoácido nas posições 117-141 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem" se refere a resíduos de aminoácidos nas posições 117-141 do polipeptídeo como mostrado na SEQ ID N°: 3. No entanto, um versado na técnica compreende que HPV70 do tipo selvagem pode incluir vários isolados, e pode haver diferença na sequência de aminoácido de proteína L1 dentre vários isolados. Ainda, um versado na técnica compreende que embora possa haver diferença em sequência, as sequências de aminoácido de proteína L1 têm uma identidade muito alta (geralmente maior do que 95%, por exemplo, maior do que 96%, maior do que 97%, maior do que 98% ou maior do que 99%) dentre isolados de HPV70 diferentes, e têm substantivamente a mesma função biológica. Portanto, na invenção, o

termo "proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem" inclui não apenas a proteína como mostrado na SEQ ID N°: 3, mas também proteína L1 de vários isolados de HPV70 (tal como proteína L1 de HPV70 como mostrado em AGU90846.1, AGU90854.1, AAC54879.1 e P50793.1). Além disso, quando um fragmento de sequência de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem é descrito, ele inclui não apenas o fragmento de sequência de SEQ ID N°: 3, mas também o fragmento de sequência correspondente de proteína L1 de vários isolados de HPV70. Por exemplo, a expressão "resíduos de aminoácido nas posições 117-141 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem" inclui os resíduos de aminoácido nas posições 117-141 de SEQ ID N°: 3, e o fragmento correspondente de proteína L1 de vários isolados de HPV70.

[0052] De acordo com a invenção, a expressão "fragmentos de sequência correspondentes" ou "fragmentos correspondentes" se refere a fragmentos que estão localizados em posições equivalentes das sequências sendo comparadas quando as sequências são otimamente alinhadas, isto é, as sequências são alinhadas para obter a porcentagem de identidade mais alta.

[0053] De acordo com a invenção, a expressão "truncamento N-terminal de aminoácidos X" ou "tendo X aminoácidos truncados no terminal N" se refere à substituição dos resíduos de aminoácido das posições 1 a X no terminal N de uma proteína com resíduo metionina codificado por um códon iniciador (para início de tradução de proteína). Por exemplo, uma proteína L1 de HPV39 tendo 15 aminoácidos truncados no terminal N se refere a uma proteína que resultou da substituição de resíduos de aminoácido das posições 1 a 15 no terminal N de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduo metionina codificado por um outro códon iniciador.

[0054] De acordo com a invenção, o termo "variante" se refere a uma proteína cuja sequência de aminoácido tem substituição

(preferivelmente substituição conservativa), adição ou deleção de um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9) aminoácidos ou tem uma identidade de pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, comparado com a proteína L1 de HPV39 mutada de acordo com a invenção (por exemplo, a proteína como mostrado na SEQ ID N°: 7, 10, 11 ou 12), e que retém uma função da proteína L1 de HPV39 mutada de acordo com a invenção. Na invenção, o termo "função da proteína L1 de HPV39 mutada" se refere a uma capacidade de indução de geração de anticorpos de neutralização contra pelo menos dois tipos de HPV (por exemplo, HPV39 e HPV68 ou HPV39, HPV68 e HPV70). O termo "identidade" se refere a uma medição de similaridade entre sequências de nucleotídeo ou sequências de aminoácido. Em geral, sequências foram alinhadas para obter uma correspondência máxima. "Identidade" tem significados bem conhecidos na técnica e pode ser calculada através de algoritmo publicado (tal como BLAST).

[0055] De acordo com a invenção, o termo "identidade" se refere ao grau de correspondência entre dois polipeptídeos ou entre dois ácidos nucleicos. Quando duas sequências para comparação têm a mesma subunidade de monômero de base ou aminoácido em um certo sítio (por exemplo, cada uma das duas moléculas de DNA tem uma adenina em um certo sítio ou cada um de dois polipeptídeos tem uma lisina em um certo sítio), as duas moléculas são idênticas no sítio. A identidade percentual entre duas sequências é uma função do número de sítios idênticos compartilhados pelas duas sequências no número total de sítios para comparação x 100. Por exemplo, se 6 de 10 sítios de duas sequências foram correspondentes, essas duas sequências têm uma identidade de 60%. Por exemplo, sequências de DNA: CTGACT e CAGGTT compartilham uma identidade de 50% (3 de 6 sítios são correspondentes). Em geral, a comparação de duas sequências é conduzida de uma maneira a produzir identidade máxima. Tal

alinhamento pode ser conduzido usando, por exemplo, um programa de computador tal como programa Align (DNASTar, Inc.) que é baseado no método de Needleman e outros (*J. Mol. Biol.* 48:443-453, 1970). A identidade percentual entre duas sequências de aminoácido pode ser também determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que foi incorporado ao programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduo de ponderação PAM120, e com uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Ainda, a porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácido pode ser determinada através do algoritmo de Needleman e Wunsch (*J. Mol. Biol.*, 48:444-453 (1970)), que foi incorporado ao programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando ou uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e com um peso de lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[0056] Como aqui usado, o termo "substituição conservativa" se refere às substituições de aminoácido que não afetariam ou modificassem desvantajosamente as propriedades essenciais de uma proteína/polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido. Por exemplo, uma substituição conservativa pode ser introduzida através de técnicas padrão conhecidas na técnica tais como mutagênese direcionada a sítio e mutagênese mediada por PCR. Substituições de aminoácido conservativas incluem substituições em que um resíduo de aminoácido é substituído com um outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar, por exemplo, um resíduo fisicamente ou funcionalmente similar (tal como tendo tamanho, formato, carga, propriedade química similar incluindo a capacidade de formar ligação covalente ou ligação de hidrogênio, etc.) ao resíduo de aminoácido correspondente. As famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Essas famílias incluem

aminoácidos tendo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina e histidina), aminoácidos tendo cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico e ácido glutâmico), aminoácidos tendo cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína e triptofano), aminoácidos tendo cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina e metionina), aminoácidos tendo cadeias laterais β -ramificadas (tais como treonina, valina e isoleucina) e aminoácidos tendo cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano e histidina). Portanto, geralmente uma substituição conservativa se refere a uma substituição de um resíduo de aminoácido correspondente com um outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Métodos para identificação de substituições de aminoácido conservativas são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Brummell e outros, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi e outros, *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); e Burks e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997), que são aqui incorporados a título de referência).

[0057] De acordo com a presente invenção, o termo "sistema de expressão de *E. coli*" se refere a um sistema de expressão consistindo em *E. coli* (cepa) e um vetor, em que a *E. coli* (cepa) é derivada das cepas comercialmente disponíveis incluindo, mas não limitado a: ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3) e BLR (DE3).

[0058] De acordo com a invenção, o termo "vetor" se refere a uma ferramenta veicular de ácido nucleico que pode ter um polinucleotídeo inserido na mesma. Quando o vetor permite a expressão da proteína codificada pelo polinucleotídeo inserido no mesmo, o vetor é chamado um vetor de expressão. O vetor pode ter os elementos de material genético carregados expressos em uma célula hospedeira através de transformação, transdução ou transfecção na célula hospedeira.

Vetores são bem conhecidos de um versado na técnica incluindo, mas não limitado a, plasmídeos, fagos, cosmídeos, etc.

[0059] De acordo com a invenção, o termo "um veículo e/ou excipiente farmacologicamente aceitável" se refere a um veículo e/ou excipiente que é farmacologicamente e/ou fisiologicamente compatível com um indivíduo e ingredientes ativos, o que é bem conhecido na técnica (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), incluindo, mas não limitado a: reguladores de pH, tensoativos, adjuvantes e potencializadores de resistência iônica. Por exemplo, reguladores de pH incluem, mas não estão limitados a, tampões de fosfato; tensoativos incluem, mas não estão limitados a: tensoativos catiônicos, tensoativos aniônicos ou tensoativos não iônicos, por exemplo, Tween-80; adjuvantes incluem, mas não estão limitados a, adjuvante de alumínio (por exemplo, hidróxido de alumínio) e adjuvante de Freund (por exemplo, adjuvante de Freund completo); e potencializadores de resistência iônica incluem, mas não estão limitados a, NaCl.

[0060] De acordo com a invenção, o termo "uma quantidade eficaz" se refere a uma quantidade que pode atingir efetivamente o propósito pretendido. Por exemplo, uma quantidade eficaz para prevenir uma doença (tal como infecção por HPV) se refere a uma quantidade eficaz para prevenir, suprimir ou retardar a ocorrência de uma doença (tal como infecção por HPV). A determinação de tal quantidade eficaz está dentro da habilidade de um versado na técnica.

[0061] De acordo com a invenção, o termo "cromatografia" inclui, mas não está limitado a: cromatografia de troca iônica (tal como cromatografia de troca catiônica), cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia absorvente (tal como cromatografia de hidroxiapatita), cromatografia de filtragem em gel (cromatografia de exclusão de gel) e cromatografia por afinidade.

[0062] De acordo com a invenção, o termo "sobrenadante de lisato" se refere a uma solução produzida através das etapas que seguem: células hospedeiras (tal como *E. coli*) são rompidas em um tampão de lise, e as substâncias insolúveis são então removidas da solução de lisato contendo as células hospedeiras rompidas. Vários tampões de lise são bem conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitado a, tampões de Tris, tampões de fosfato, tampões de HEPES, tampões de MOPS, etc. Ainda, o rompimento de uma célula hospedeira pode ser realizado através de métodos bem conhecidos de um versado na técnica incluindo, mas não limitado a, rompimento por homogeneizador, tratamento ultrassônico, trituração, extrusão em pressão alta, tratamento com lisozima, etc. Métodos para remoção de substâncias insolúveis são também bem conhecidos por um versado na técnica incluindo, mas não limitado a, filtração e centrifugação.

Efeitos Benéficos da Invenção

[0063] Estudos mostraram que embora haja uma certa proteção cruzada entre HPV39 e outro(s) tipo(s) de HPV (tais como HPV68 e HPV70), tal proteção cruzada é muito baixa, geralmente menor do que um por cento, até mesmo um milésimo do nível de proteção de VLP do mesmo tipo de HPV. Portanto, um indivíduo vacinado com vacina para HPV39 ainda tem um risco alto de ser infectado por outro(s) tipo(s) de HPV (tais como HPV68 e HPV70).

[0064] A invenção provê uma proteína L1 de HPV39 mutada e uma partícula do tipo vírus HPV formada pela mesma. A partícula do vírus tipo HPV de acordo com a invenção pode prover proteção cruzada significativa contra HPV39 e outro(s) tipo(s) de HPV (tais como HPV68 e HPV70). Especialmente, na mesma dose de imunização, a partícula do tipo vírus HPV de acordo com a invenção pode induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra pelo menos dois tipos de HPV (por exemplo, HPV39 e HPV68 ou HPV39, HPV68 e HPV70)

em organismos, e seu efeito é comparável àquele de uma mistura de VLPs de tipos de HPV múltiplos (por exemplo, uma mistura de VLP de HPV39 e VLP de HPV68 ou uma mistura de VLP de HPV39, VLP de HPV68 e VLP de HPV70). Portanto, a partícula do tipo vírus de HPV de acordo com a invenção pode ser usada para prevenir infecção por pelo menos dois tipos de HPV (por exemplo, HPV39 e HPV68 ou HPV39, HPV68 e HPV70) ao mesmo tempo bem como doenças associadas com a infecção, e tem efeitos técnicos significativamente benéficos. Isso tem vantagens particularmente significantes em termos de extensão da faixa de proteção de vacinas para HPV e redução do custo de produção de vacinas para HPV.

[0065] As modalidades da invenção são descritas adicionalmente em detalhes através de referência aos desenhos e exemplos. No entanto, um versado na técnica compreenderia que os desenhos e exemplos que seguem são pretendidos para ilustração da invenção apenas, ao invés de definição do escopo da invenção. De acordo com a descrição detalhada dos desenhos e modalidades preferidas que seguem, vários propósitos e vantagens da invenção são aparentes para um versado na técnica.

Descrição dos Desenhos

[0066] A Figura 1 mostra o resultado de SDS-PAGE das proteínas mutadas purificadas no Exemplo 1. Faixa 1: marcador de peso molecular de proteína; Faixa 2: HPV39N15 (proteína L1 de HPV39 tendo 15 aminoácidos truncados no terminal N); Faixa 3: HPV68N0 (proteína L1 de HPV68 tendo 0 aminoácido truncado no terminal N, isto é, proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem de comprimento integral); Faixa 4: H39N15-68T1; Faixa 5: H39N15-68T2; Faixa 6: H39N15-68T3; Faixa 7: H39N15-68T4; Faixa 8: H39N15-68T5; Faixa 9: marcador de peso molecular de proteína; Faixa 10: H39N15-68T4; Faixa 11: HPV70N10 (proteína L1 de HPV70 tendo 10 aminoácidos truncados no

terminal N); Faixa 12: H39N15-68T4-70S1; Faixa 13: H39N15-68T4-70S2; Faixa 14: H39N15-68T4-70S3; Faixa 15: H39N15-68T4-70S5. O resultado mostrou que após purificação cromatográfica, as proteínas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 atingiram uma pureza de mais de 90%.

[0067] A Figura 2 mostra o resultado de *Western blot* das proteínas mutadas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 preparadas no Exemplo 1, conforme determinado usando um anticorpo de amplo espectro 4B3. Faixa 1: HPV39N15; Faixa 2: HPV68N0; Faixa 3: H39N15-68T1; Faixa 4: H39N15-68T2; Faixa 5: H39N15-68T3; Faixa 6: H39N15-68T4; Faixa 7: H39N15-68T5; Faixa 8: H39N15-68T4; Faixa 9: HPV70N10; Faixa 10: H39N15-68T4-70S1; Faixa 11: H39N15-68T4-70S2; Faixa 12: H39N15-68T4-70S3; Faixa 13: H39N15-68T4-70S5. O resultado mostrou que as proteínas mutadas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 poderiam ser especificamente reconhecidas pelo anticorpo de amplo espectro 4B3.

[0068] A Figura 3 mostra os resultados das amostras compreendendo as proteínas HPV39N15, H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4 e H39N15-68T5, conforme analisados através de cromatografia de peneira molecular. Os resultados mostraram que o primeiro pico de proteína das amostras compreendendo as proteínas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4 ou H39N15-68T5 apareceu em cerca de 13-14 min, o que era comparável àquele de HPV39N15. Isso mostrou que todas essas proteínas eram capazes de se reunir em VLPs.

[0069] A Figura 4 mostra os resultados das amostras

compreendendo as proteínas HPV39N15, HPV68L1N0, HPV70N10, H39N15-68T4, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5, conforme analisado através de cromatografia de peneira molecular. Os resultados mostraram que o primeiro pico de proteína das amostras compreendendo as proteínas H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 ou H39N15-68T4-70S5 apareceu em cerca de 13-14 min, o que era comparável àquele de HPV39N15, HPV68L1N0, HPV70N10 e H39N15-68T4 VLP. Isso mostrou que todas essas proteínas foram capazes de se reunir em VLPs.

[0070] As Figuras 5A-5L mostram os resultados de análise de velocidade de sedimentação de HPV39N15 VLP, HPV68L1N0 VLP, HPV70N10 VLP, H39N15-68T1 VLP, H39N15-68T2 VLP, H39N15-68T3 VLP, H39N15-68T4 VLP, H39N15-68T5 VLP, H39N15-68T4-70S1 VLP, H39N15-68T4-70S2 VLP, H39N15-68T4-70S3 VLP e H39N15-68T4-70S5 VLP. Figura 5A, HPV39N15 VLP; Figura 5B, HPV68L1N0 VLP; Figura 5C, H39N15-68T1 VLP; Figura 5D, H39N15-68T2 VLP; Figura 5E, H39N15-68T3 VLP; Figura 5F, H39N15-68T4 VLP; Figura 5G, H39N15-68T5 VLP; Figura 5H, HPV70N10 VLP; Figura 5I, H39N15-68T4-70S1 VLP; Figura 5J, H39N15-68T4-70S2 VLP; Figura 5K, H39N15-68T4-70S3 VLP; Figura 5L, H39N15-68T4-70S5 VLP. Os resultados mostraram que os coeficientes de sedimentação de H39N15-68T1 VLP, H39N15-68T2 VLP, H39N15-68T3 VLP, H39N15-68T4 VLP, H39N15-68T5 VLP, H39N15-68T4-70S1 VLP, H39N15-68T4-70S2 VLP, H39N15-68T4-70S3 VLP e H39N15-68T4-70S5 VLP foram 136S, 151S, 138S, 145S, 135S, 124S, 108S, 99S e 127S, respectivamente. Isso mostrou que as proteínas mutadas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 eram capazes de se reunir em partículas do tipo vírus que eram similares à

VLP do tipo selvagem VLP (HPV39N15 VLP, 115S; HPV68N0 VLP, 153S; HPV70N10 VLP, 144S) em termos de tamanho e morfologia.

[0071] As Figuras 6A-6L mostram as fotografias de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (tiradas em ampliação de 100.000x, Bar=0,1 μm) de várias amostras de VLP, FIG.6A, VLP montada por HPV39N15; FIG.6B, VLP montada por HPV68L1N0; FIG.6C, VLP montada por HPV70N10; FIG.6D, VLP montada por H39N15-68T1; FIG.6E, VLP montada por H39N15-68T2; FIG.6F, VLP montada por H39N15-68T3; FIG.6G, VLP montada por H39N15-68T4; FIG.6H, VLP montada por H39N15-68T5; FIG.6I, VLP montada por H39N15-68T4-70S1; FIG.6J, VLP montada por H39N15-68T4-70S2; FIG.6K, VLP montada por H39N15-68T4-70S3; FIG.6L, VLP montada por H39N15-68T4-70S5. Os resultados mostraram que H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 eram similares à HPV39N15, HPV68L1N0 e HPV70N10, e foram capazes de se reunir em VLPs com um raio de cerca de 25-30 nm.

[0072] As Figuras 7A-7C mostram o resultado de título de anticorpo de neutralização em soro de camundongo após vacinação de camundongos com VLP H39N15-68T1, VLP H39N15-68T2, VLP H39N15-68T3, VLP H39N15-68T4 ou VLP H39N15-68T5. Figura 7A: grupo 1 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 5 μg , usando adjuvante de alumínio); Figura 7B: grupo 2 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 1 μg , usando adjuvante de alumínio); Figura 7C: grupo 3 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 0,2 μg , usando adjuvante de alumínio). O resultado mostrou que VLP H39N15-68T4 foi capaz de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV39 em camundongos, e seu efeito protetor foi ligeiramente menor do que aquele de VLP HPV39N15 sozinha na mesma dose, mas foi

significativamente superior àquele de VLP HPV68N0 na mesma dose; e ela foi capaz de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV68 em camundongos, e seu efeito protetor foi ligeiramente menor do que aquele de VLP de HPV68N0 sozinha na mesma dose, mas foi significativamente superior àquele de VLP de HPV39N15 sozinha na mesma dose. Isso mostrou que VLP H39N15-68T4 tinha boa imunogenicidade cruzada e proteção cruzada contra HPV39 e HPV68.

[0073] As Figuras 8A-8C mostram o resultado de título de anticorpo de neutralização em soro de camundongo após vacinação de camundongos com H39N15-68T4-70S1 VLP, H39N15-68T4-70S2 VLP, H39N15-68T4-70S3 VLP e H39N15-68T4-70S5 VLP. Figura 8A: grupo 1 de adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 5 µg, usando adjuvante de alumínio); Figura 8B: grupo 2 de adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 1 µg, usando adjuvante de alumínio); Figura 8C: grupo 3 de adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 0,2 µg, usando adjuvante de alumínio). O resultado mostrou que H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 VLP foi capaz de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV39 em camundongos, e seus efeitos protetores foram ligeiramente mais fracos do que aquele de VLP de HPV39N15 e aquele da VLP de HPV39/HPV68/HPV70 na mesma dose, mas significativamente superior àquele de VLP HPV68N0 e aquele de VLP de HPV70N10 sozinha na mesma dose; e elas foram capazes de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV68 em camundongos, e seus efeitos protetores foram comparáveis àqueles de VLP HPV68N0 sozinha e aqueles da VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista na mesma dose, e foi significativamente superior àquele de VLP HPV39N15 sozinha e aquele de VLP HPV70N10 sozinha na mesma dose; e elas foram capazes de induzir a

geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV70 em camundongos, e seus efeitos protetores eram comparáveis àqueles de VLP HPV70N10 sozinha e aqueles da VLP de HPV39/HPV68/HPV70 na mesma dose, e foram significativamente superiores àqueles de VLP HPV39N15 sozinha e aqueles de VLP HPV68N0 sozinha na mesma dose. Isso mostrou que VLP de H39N15-68T4-70S2, VLP de H39N15-68T4-70S3 e VLP de H39N15-68T4-70S5 tinham imunogenicidade cruzada e proteção cruzada boas contra HPV39, HPV68 e HPV70.

[0074] A Figura 9 mostra os resultados de detecção de termoestabilidade de VLP HPV39N15, VLP HPV68N0, VLP HPV70N10, VLP H39N15-68T4, VLP H39N15-68T4-70S2 e VLP H39N15-68T4-70S5, em que A mostra os resultados de detecção de termoestabilidade de VLP de HPV39N15; B mostra os resultados de detecção de termoestabilidade de VLP de HPV68L1N0; C mostra os resultados de detecção de termoestabilidade de VLP de HPV70N10; D mostra os resultados de detecção de termoestabilidade de VLP de H39N15-68T4; E mostra os resultados de detecção de termoestabilidade de VLP de H39N15-68T4-70S2; F mostra os resultados de detecção de termoestabilidade de VLP de H39N15-68T4-70S5. Os resultados mostraram que todas as VLPs formadas por essas proteínas tinham termoestabilidade muito alta.

[0075] A Figura 10 mostra as fotografias de microscopia crio-eletrônica (cryo-EM) e as estruturas tridimensionais reconstruídas de VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5, em que A mostra a fotografia de microscopia crio-eletrônica (cry-EM) de VLP de H39N15-68T4-70S2; B mostra a estrutura tridimensional reconstruída de VLP de H39N15-68T4-70S2; C mostra a fotografia de microscopia crio-eletrônica (cryo-EM) de VLP de H39N15-68T4-70S5; D mostra a estrutura tridimensional reconstruída de VLP de H39N15-68T4-70S5. As estruturas tridimensionais reconstruídas mostraram que ambas VLP

de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5 tinham uma estrutura icosaedral $T=7$ ($h=1$, $k=2$) consistindo em 72 capsômeros (subunidade morfológica, pentâmero). Diferente dos capsídeos virais icosaedrais convencionais consistentes com princípio de quase-equivalência, todas as subunidades constitutivas nas estruturas de VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5 eram pentâmeros, sem hexâmero. Além disso, as ditas VLPs tinham um diâmetro externo de cerca de 55 nm. Essas eram similares às estruturas tridimensionais das partículas virais de HPV naturais anteriormente reportadas e VLP de HPV preparada através de sistema de expressão eucariótico (por exemplo, sistema de expressão de poxvírus) (Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H. e outros, *Biophys J.* (1991), 60(6): 1445-1456. Hagensee, M.E., Olson, N.H., Baker, T.S. e outros, *J Virol.* (1994), 68(7):4503-4505. Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D. et al, *J Virol.* (2008), 82(11): 5190-7).

Informação de Sequência

[0076] Algumas das sequências envolvidas na invenção são providas na Tabela 1 que segue.

Tabela 1: Descrição de Sequências

SEQ ID Nº:	Descrição
1	proteína L1 de HPV39 L1 do tipo selvagem
2	proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, HPV68N0
3	proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem
4	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 1 da proteína L1 de HPV68, H39N15-68T1
5	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 2 de proteína L1 de HPV68, H39N15-68T2

SEQ ID Nº:	Descrição
6	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 3 de proteína L1 de HPV68, H39N15-68T3
7	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 4 de proteína L1 de HPV68, H39N15-68T4
8	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 5 de proteína L1 de HPV68, H39N15-68T5
9	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 4 de proteína L1 de HPV68 e Segmento 1 de proteína L1 de HPV70, H39N15-68T4-70S1
10	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 4 de proteína L1 de HPV68 e Segmento 2 de proteína L1 de HPV70, H39N15-68T4-70S2
11	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 4 de proteína L1 de HPV68 e Segmento 3 de proteína L1 de HPV70, H39N15-68T4-70S3
12	a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo o Segmento 4 de proteína L1 de HPV68 e Segmento 5 de proteína L1 de HPV70, H39N15-68T4-70S5
13	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:1
14	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:2
15	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:3
16	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:4
17	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:5
18	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:6

SEQ ID Nº:	Descrição
19	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:7
20	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:8
21	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:9
22	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:10
23	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:11
24	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:12
25	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 270-289 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, isto é, Segmento 4 de proteína L1 de HPV68
26	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 117-141 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem, isto é, Segmento 2 de proteína L1 de HPV70
27	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 170-182 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem, isto é, Segmento 3 de proteína L1 de HPV70
28	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 348-359 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem, isto é, Segmento 5 de proteína L1 de HPV70
29	a proteína L1 de HPV39 L1 tendo 15 aminoácidos truncados no terminal N, HPV39N15
30	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:29
31	a proteína L1 de HPV70 tendo 10 aminoácidos truncados no terminal N, HPV70N10

SEQ ID Nº:	Descrição
32	a sequência de DNA codificando SEQ ID Nº:31
33	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 53-61 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, isto é, Segmento 1 de proteína L1 de HPV68
34	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 117-151 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, isto é, Segmento 2 de proteína L1 de HPV68
35	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 170-182 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, isto é, Segmento 3 de proteína L1 de HPV68
36	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 348-359 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, isto é, Segmento 5 de proteína L1 de HPV68
37	a sequência dos resíduos de aminoácido nas posições 53-61 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem, isto é, Segmento 1 de proteína L1 de HPV70

Sequência 1 (SEQ ID Nº: 1):

MALWRSSDSMVYLPSPVAKVVNTDDYVTRTGIYYYAGSSRLLTVGHPYF
KVG MNGGRKQDIPKVSAYQYRVFRVTL PDPNKFSIPDASLYNPETQRLVW
ACVGVEVGRGQPLGVGISGHPLYNRQDDTENS PFSSTTNKDSRDNVSDY
KQTQLCIIGCVPAIGEHWGKGKACKPNNVSTGDCPPLELVNTPIEDGDMIDT
GYGAMDFGALQETKSEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFFCLRRE
QLFARHFWRNRGGMVGD AIPAQLYIKGTDIRANPGSSVYCPSPSGSMVTSD
SQLFNKPYWLHKAQGHNNGICWHNQLFLTVVDTTRSTNFTLSTSISSIPST
YDPSKFKEYTRHVEEYDLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAV
APPPSASLVDTYRYLQSAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSL
ELDQFPLGRKFLLQARVRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVSK

Sequência 2 (SEQ ID N°: 2):

MALWRASDNMVYLPSPSVAKVVNTDDYVTRTGMYYYAGTSRLLTVGHPYF
KVPMSGGRKQGIPKVSAYQYRVFRVTLDPDNKFSVPESTLYNPDTQRMVW
ACVGVEIGRGQPLGVGLSGHPLYNRLDDTENSFPSSNKNPKDSRDNAVD
CKQTQLCIIGCVPAIGEHWAKGKSCPTNVQQGDCPPELVNTPIEDGDMI
DTGYGAMDFGTLQETKSEVPLDICQSVCKYDPDYLMQMSADVYGDSMFFCLR
REQLFARHFWNRGGMVGDITPTDMYIKGTDIRETPSSYVYAPSPSGSMVS
SDSQLFNKPYWLHKAQGHNNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTTTDSTV
PAVYDSNKFKEYVRHVEEYDLQFIFQLCTITLSTDVMSYIHTMNPAILDDWN
FGVAPPPSASLVDTYRYLQSAAITCQKDAPAPVKKDPYDGLNFWNVDLKEK
FSSELDQFPLGRKFLLQAGVRRRPTIGPRKRTATAATTSTSKHKRKRVS

Sequência 3 (SEQ ID N°: 3):

MALWRSSDNTVYLPSPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYAGSSRLLTVGHPYFK
VPVNGGRKQEIPKVSAYQYRVFRVSLDPDNKFGLPDPSLYNPDTQRLVWA
CIGVEIGRGQPLGVGVSGHPLYNRLDDTENSHPSSAVNTQDSRDNVSDY
KQTQLCIIGCVPAMGEHWAKGKACKSTTVQQGDCPPELVNTAIEDGDMID
TGYGAMDFRTLQETKSEVPLDICQSVCKYDPDYLMQMSADVYGDSMFFCLR
EQLFARHFWNRGGMVGDITPSELYIKGTDIRDRPGTHVYSPSPSGSMVSS
DSQLFNKPYWLHKAQGHNNGICWHNQLFITVDTRSTNFTLSACTETAIP
AVYSPTKFKEYTRHVEEYDLQFIFQLCTITLTADVMAIHTMNPAILDNWNIG
VTPPPSASLVDTYRYLQSAAIACQKDAPAPEKKDPYDDLKFWNVDLKEKFS
TELDQFPLGRKFLLQVGARRRPTIGPRKRPAKSSSSASKHKRKRVS

Sequência 4 (SEQ ID N°: 4):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYAGSSRLLTVGHPYFKVPMSGGRKQGIPKV
SAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVEVGRGQPLGV
GISGHPLYNRQDDTENSFPSSSTTNKDSRDNVSDYKQTQLCIIGCVPAIGEH
WGKKGACKPNNVSTGDCPPELVNTPIEDGDMIDTGYGAMDFGALQETKS
EVPLDICQSICKYDPDYLMQMSADVYGDSMFFCLRREQLFARHFWNRGGMVG
DAIPAQLYIKGTDIRANPGSSVYCPSPSGSMVTS SQLFNKPYWLHKAQGH
NNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTSISSIPSTYDPSKFKEYTRHVEEY
DLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDTYRYLQ
SAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQAR
VRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 5 (SEQ ID N°: 5):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQDIPK
VSAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVEVGRGQPLG
VGLSGHPLYNRLDDTENSFPSSNKNPKDSRDNVAVDCKQTQLCIIGCVPAI
GEHWGKKGKACKPNNVSTGDCPPELVNTPIEDGDMIDTGYGAMDFGALQE
TKSEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFFCLRREQLFARHFWNRGG
MVGDAIPAQLYIKGTDIRANPGSSVYCPSPSGSMVTSDSQLFNKPYWLHKA
QGHNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTSISSIPSTYDPSKFKEYTRHV
EEYDLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDTYR
YLQSAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLL
QARVRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 6 (SEQ ID N°: 6):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQDIPK
VSAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVEVGRGQPLG
VGISGHPLYNRQDDTENSFPSSSTTNKDSRDNVSDYKQTQLCIIGCVPAIGE
HWAKGKSKPTNVQQGDCPPELVNTPIEDGDMIDTGYGAMDFGALQETK
SEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFFCLRREQLFARHFWNRGGMV
GDAIPAQLYIKGTDIRANPGSSVYCPSPSGSMVTSDSQLFNKPYWLHKAQG
HNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTSISSIPSTYDPSKFKEYTRHVEE
YDLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDTYRYL
QSAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQA
RVRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 7 (SEQ ID N°: 7):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQDIPK
VSAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVEVGRGQPLG
VGISGHPLYNRQDDTENSFPSSSTTNKDSRDNVSDYKQTQLCIIGCVPAIGE
HWGKKGKACKPNNVSTGDCPPELVNTPIEDGDMIDTGYGAMDFGALQETK
SEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFFCLRREQLFARHFWNRGGMV
GDTIPTDMYIKGTDIRETPSSVYVYCPSPSGSMVTSDSQLFNKPYWLHKAQG
HNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTSISSIPSTYDPSKFKEYTRHVEE
YDLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDTYRYL
QSAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQA
RVRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 8 (SEQ ID N°: 8):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQDIPK
VSAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVGVGRGQPLG
VGISGHPLYNRQDDTENSFSSSTTNKDSRDNVSDYKQTQLCIIGCVPAIGE
HWGKKGKACKPNNVSTGDCPPLELVNTPIEDGDMIDTGYGAMDFGALQETK
SEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFFCLRREQLFARHFWNRGGMV
GDAIPAQLYIKGTDIRANPGSSVYCPSPSGSMVTSDSQLFNKPYWLHKAQG
HNNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTSTDSTVPAVYDSNKFKEYTRHVE
EYDLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDYRY
LQSAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQ
ARVRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 9 (SEQ ID N°: 9):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVPVNGGRKQEIPKV
SAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVGVGRGQPLGV
GISGHPLYNRQDDTENSFSSSTTNKDSRDNVSDYKQTQLCIIGCVPAIGEH
WGKKGKACKPNNVSTGDCPPLELVNTPIEDGDMIDTGYGAMDFGALQETKS
EVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFFCLRREQLFARHFWNRGGMVG
DTIPTDMYIKGTDIRETPSSYVYCPSPSGSMVTSDSQLFNKPYWLHKAQGH
NNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTSISSIPSTYDPSKFKEYTRHVEEY
DLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDYRYLQ
SAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQAR
VRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 10 (SEQ ID N°: 10):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQDIPK
VSAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVGVGRGQPLG
VGVSGHPLYNRLDDTENSFSSAVNTQDSRDNVSDYKQTQLCIIGCVPAI
GEHWGKKGKACKPNNVSTGDCPPLELVNTPIEDGDMIDTGYGAMDFGALQE
TKSEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFFCLRREQLFARHFWNRGG
MVGDTIPTDMYIKGTDIRETPSSYVYCPSPSGSMVTSDSQLFNKPYWLHKA
QGHNNGICWHNQLFLTVDTRSTNFTLSTSISSIPSTYDPSKFKEYTRHV
EEYDLQFIFQLCTVTLTTDVMSYIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDYR
YLQSAAITCQKDAPAPEKKDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLL
QARVRRRPTIGPRKRPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 11 (SEQ ID N°: 11):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQ
DIPKVSAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVEV
GRGQPLGVGISGHPLYNRQDDTENSFSSSTTNKDSRDNVSDYKQT
QLCIIGCVPAIGEHWAKGKACKSTTVQQGDCPPLELVNTPIEDGDMID
TGYGAMDFGALQETKSEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFF
CLRREQLFARHFWRNRGGMVGD TIPTDMYIKGTDIRETPSSYVYCPSP
SGSMVTSDSQLFNKPYWLHKAQGHNNGICWHNQLFLTVDTRSTN
FTLSTSISSIPSTYDPSKFKEYTRHVEEYDLQFIFQLCTVTLTTDVMS
YIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDTYRYLQSAAITCQKDAPAPEK
KDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQARVRRRPTIGPRK
RPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 12 (SEQ ID N°: 12):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQ
DIPKVSAYQYRVFRVTLDPDNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVEV
GRGQPLGVGISGHPLYNRQDDTENSFSSSTTNKDSRDNVSDYKQT
QLCIIGCVPAIGEHWGKGKACKPNNVSTGDCPPLELVNTPIEDGDMID
TGYGAMDFGALQETKSEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFF
CLRREQLFARHFWRNRGGMVGD TIPTDMYIKGTDIRETPSSYVYCPSP
SGSMVTSDSQLFNKPYWLHKAQGHNNGICWHNQLFLTVDTRSTN
FTLSTSTETAIPAVYSPTKFKEYTRHVEEYDLQFIFQLCTVTLTTDVMS
YIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDTYRYLQSAAITCQKDAPAPEK
KDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQARVRRRPTIGPRK
RPAASTSSSSATKHKRKRVS

Sequência 13 (SEQ ID N°: 13):

ATGGCCCTCTGGCGCAGCTCCGATTCCATGGTCTACCTCCCCCCC
CCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTCACCCG
CACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCG
TGGGCCACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAG
CAGGATATCCCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCG

CGTCACCCTCCCAGACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAG
CCTGTACAACCCCGAGACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGG
GCGTCGAAGTCGGGCGCGGGCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTC
CGGCCACCCCCTGTACAACCGCCAGGACGACACCGAGAATAGCC
CCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTCCCGCGACAACGTCAGCG
TCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCATCGGGTGCCTCCAG
CAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCTGTAAGCCAAAC
AACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCTGGAGCTGGTGAATAC
ACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCGCCA
TGGATTTTCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCCTG
GACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATG
AGCGCCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCG
CGAGCAGCTCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACCGCGGGCGGCATGG
TCGGCGATGCAATCCCCGCACAGCTCTACATCAAGGGGACCGAC
ATCCGCGCCAATCCAGGCTCCAGCGTGTATTGTCCAAGCCCATCC
GGCAGCATGGTGACAAGCGACAGCCAGCTGTTCAACAAGCCCTA
CTGGCTGCACAAGGCACAGGGGCATAATAACGGCATCTGCTGGC
ACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTGATACACACGCTCCACAA
ATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAGCATCCCCAGCACCT
ACGACCCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCACGTCGAAGAAT
ACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCCTGACCA
CCGACGTCATGAGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCTCG
ATAACTGGAACCTTCGCCGTGGCCCCCCCCCCCCAGCGCATCCCTC
GTGGATACCTATCGCTATCTGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAG
AAGGACGCCCCCGCCCCGAGAAGAAGGACCCCTACGATGGCCT
GAAGTTCTGGAACGTCGATCTGCGCGAGAAGTTCTCCCTGGAGCT
GGACCAGTTCCCCCTCGGCCGCAAGTTCCTCCTCCAGGCACGCG
TGCGCCGCCGCCACCATCGGCCACGCAAGCGCCCCGCCGC
CAGCACCAGCAGCAGCAGCGCCACCAAGCACAAGCGCAAGCGC
GTCAGCAAGTGA

Sequência 14 (SEQ ID N°: 14):

ATGGCACTGTGGAGAGCCAGCGACAACATGGTGTACCTGCCCCCTCCC
AGCGTGGCCAAGGTGGTCAACACCGACTACGTGACCCGGACCGG
CATGTACTACTACGCCGGCACCTCTCGGCTCCTGACCGTGGGCCACCC
CTACTTCAAGGTGCCCATGAGCGGCGGCAGAAAGCAGGGCATCCCCAA
GGTGTCCGCCTACCAGTACCGGGTGTTCAGAGTGACCCTGCCCGACCC
CAACAAGTTCAGCGTGCCCGAGAGCACCCCTGTACAACCCCGACACCCA
GCGGATGGTCTGGGCCTGCGTGGGCGTGGAGATCGGCAGAGGCCAGC
CCCTGGGCGTGGGCCTGAGCGGCCACCCCTGTACAATCGGCTGGAC
GACACCGAGAACAGCCCCTTTCAGCAGCAACAAGAACCCCAAGGACAGC
CGGGACAACGTGGCCGTGGACTGCAAGCAGACCCAGCTGTGCATCATC
GGCTGCGTGCCTGCCATTGGCGAGCACTGGGCCAAGGGCAAGAGCTG
CAAGCCCACCAACGTGCAGCAGGGCGACTGCCCCCTCTGGAAGTGGT
CAACACACCCATCGAGGACGGCGACATGATCGACACCGGCTACGGCGC
CATGGACTTCGGCACCCCTGCAGGAAACCAAGAGCGAGGTCCCCCTGGA
CATCTGCCAGAGCGTGTGCAAGTACCCCGACTACCTGCAGATGAGCGC
CGACGTGTACGGCGACAGCATGTTCTTTTGCCTGCGGCGGGAGCAGCT
GTTTCGCCCGGCACTTCTGGAACAGAGGGCGGCATGGTCGGCGACACCAT
CCCCACCGACATGTACATCAAGGGCACCGACATCAGAGAGACACCCAG
CAGCTACGTGTACGCCCCAGCCCCAGCGGCAGCATGGTGTCCAGCG
ACAGCCAGCTGTTCAACAAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCCAGGGCC
ACAACAACGGCATCTGCTGGCACAACCAGCTGTTTCTGACCGTGGTGG
ACACCACCAGAAGCACCAACTTCACCCTGAGCACACCACCGACAGCA
CCGTGCCCGCCGTGTACGACAGCAATAAGTTCAAAGAATACGTGCGGC
ACGTGGAGGAATACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTGTGTACCATCAC
CCTGTCCACCGACGTGATGAGCTACATCCACACCATGAACCCCGCCAT
CCTGGACGACTGGAAGTTCGGCGTGGCCCCTCCCCCTAGCGCCAGCCT
GGTGGATACCTACAGATACCTGCAGAGCGCCGCCATCACCTGCCAGAA
GGACGCCCCCTGCCCCCGTGAAGAAGGACCCCTACGACGGCCTGAACTT
CTGGAATGTGGACCTGAAAGAGAAGTTCAGCAGCGAGCTGGACCAGTT
CCCCCTGGGCCGGAAGTTCCTGCTGCAAGCCGGCGTGCAGGAGAAGGC
CCACCATCGGCCCCAGAAAGCGGACCGCCACCGCAGCCACAACCTCCA
CCTCCAAGCACAAGCGGAAGCGGGTGTCCAAGTGA

Sequência 15 (SEQ ID N°: 15):

ATGGCTTTGTGGCGGTCTAGTGACAACACGGTGTATTTGCCACCCCCTT
CTGTGGCGAAGGTTGTCAATACAGATGATTATGTAACACGTACAGGCAT
ATATTATTATGCTGGAAGCTCTCGCTTATTAACAGTAGGGCATCCTTATT
TTAAGGTACCTGTAAATGGTGGCCGCAAGCAGGAAATACCTAAGGTGTC
TGCATATCAGTATAGGGTATTTAGGGTATCCCTACCTGATCCTAATAAGT
TTGGCCTTCCGGATCCTTCCCTTTATAATCCTGACACACAACGCCTGGT
ATGGGCCTGTATAGGTGTGGAAATTGGTAGAGGCCAGCCATTGGGCGT
TGGTGTTAGTGGACATCCTTTATATAATAGATTGGATGATACTGAAAATT
CACATTTTTCTCTGCTGTTAATACACAGGACAGTAGGGACAATGTGTCT
GTGGACTATAAGCAGACACAGTTATGTATTATAGGCTGTGTTCCCTGCTAT
GGGAGAGCACTGGGCAAAGGGCAAGGCCTGTAAGTCCACTACTGTACA
ACAGGGCGATTGTCCACCATTAGAATTAGTTAATACTGCAATTGAGGAT
GGCGATATGATAGATACAGGCTATGGAGCCATGGACTTTCGTACATTGC
AGGAAACCAAAGTGAGGTACCACTAGATATTTGCCAATCCGTGTGTAA
ATATCCTGATTATTTGCAGATGTCTGCTGATGTATATGGGGACAGTATGT
TTTTTTGTTTGCGCAAGGAACAGTTATTTGCCAGACACTTTTGGAATAGA
GGTGGCATGGTGGGCGACACAATAACCTTCAGAGTTATATATTAAGGCA
CGGATATACGTGATCGTCCTGGTACTCATGTATATTCCCCTTCCCCAAG
TGGCTCTATGGTTTCTTCTGATTCCCAGTTGTTTAATAAGCCCTATTGGT
TGCATAAGGCCCCAGGGACACAATAATGGCATTTGTTGGCATAACCAGTT
GTTTATTACTGTGGTGGACACTACACGTAGTACTAATTTTACATTGTCTG
CCTGCACCGAAACAGCCATACCTGCTGTATATAGCCCTACAAAGTTTAA
GGAATATACTAGGCATGTGGAGGAATATGATTTACAATTTATATTTTCAGT
TGTGTAATCACAATTAAGTGCAGACGTTATGGCCTACATCCATACTATG
AATCCTGCAATTTTGGACAATTGGAATATAGGCGTTACCCCTCCACCATC
TGCAAGCTTGGTGGACACGTATAGGTATTTACAATCAGCAGCTATAGCA
TGTCAGAAGGATGCTCCTGCACCTGAAAAAAGGATCCCTATGACGATT
TAAAATTTTGGAAATGTTGATTTAAAGGAAAAGTTTAGTACAGAAGTAGAT
CAGTTTCCCTTTGGGGCGCAAATTTTACTACAGGTAGGGGCTCGCAGAC
GTCCTACTATAGGCCCTCGCAAACGCCCTGCATCAGCTAAATCGTCTTC
CTCAGCCTCTAAACACAAACGGAAACGTGTGTCCAAGTAA

Sequência 16 (SEQ ID N°: 16):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTCACCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTGCCCATGAGCGGCGGCAGAAAGCAGGGCATC
CCCAAGGTGTCCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCGCGTCACCCTCCCA
GACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCTGAAGTCGGGCGCGG
GCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTCCGGCCACCCCTGTACAACGCCA
GGACGACACCGAGAATAGCCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTC
CCGCGACAACGTCAGCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCAT
CGGGTTCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCT
GTAAGCCAAACAACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCTGGAGCTGG
TGAATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCG
CCATGGATTTCCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCCTGG
ACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGCG
CCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAGC
TCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACCGCGGGCGGCATGGTCGGCGATGCAA
TCCCCGCACAGCTCTACATCAAGGGGACCGACATCCGCGCCAATCCAG
GCTCCAGCGTGTATTGTCCAAGCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGCG
ACAGCCAGCTGTTCAACAAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGC
ATAATAACGGCATCTGCTGGCACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTCTGA
TACCACACGCTCCACAAATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAGC
ATCCCCAGCACCTACGACCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCAC
GTCGAAGAATACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCC
TGACCACCGACGTCATGAGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCT
CGATAACTGGAACCTTCGCCGTGGCCCCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCGT
GGATACCTATCGCTATCTGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGGA
CGCCCCCGCCCCGAGAAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCTG
GAACGTCGATCTGCGCGAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCCC
CCTCGGCCGCAAGTTCTCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCCCA
CCATCGGCCACGCAAGCGCCCCGCCGCCAGCACCAGCAGCAGCAGC
GCCACCAAGCACAAGCGCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 17 (SEQ ID N°: 17):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTACCCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAGCAGGATATC
CCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCCA
GACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCAAGTCGGCAGAGG
CCAGCCCCTGGGCGTGGGCCTGAGCGGCCACCCCCTGTACAATCGGC
TGGACGACACCGAGAACAGCCCCTTCAGCAGCAACAAGAACCCCAAGG
ACAGCCGGGACAACGTGGCCGTGGACTGCAAGCAGACCCAGCTCTGTA
TCATCGGGTGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAG
GCCTGTAAGCCAAACAACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCCTGGAG
CTGGTGAATACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTAC
GGCGCCATGGATTTCCGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCC
CTGGACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGA
GCGCCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGC
AGCTCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACCGCGGCGGCATGGTCGGCGATG
CAATCCCCGCACAGCTCTACATCAAGGGGACCGACATCCGCGCCAATC
CAGGCTCCAGCGTGTATTGTCCAAGCCATCCGGCAGCATGGTGACAA
GCGACAGCCAGCTGTTCAACAAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGG
GGCATAATAACGGCATCTGCTGGCACAACCAGCTGTTCCCTGACCGTCGT
CGATACCACACGCTCCACAAATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGC
AGCATCCCCAGCACCTACGACCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGC
CACGTGAAGAATACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGA
CCCTGACCACCGACGTCATGAGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCAT
CCTCGATAACTGGAACCTTCGCCGTGGCCCCCCCCCCCCAGCGCATCCCT
CGTGGATACCTATCGCTATCTGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAA
GGACGCCCCCGCCCCGAGAAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGT
TCTGGAACGTGATCTGCGCGAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGT
TCCCCCTCGGCCGCAAGTTCCTCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGC
CCCACCATCGGCCACGCAAGCGCCCCGCCGCGCCAGCACCCAGCAGCAG
CAGCGCCACCAAGCACAAGCGCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 18 (SEQ ID N°: 18):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTACCCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAGCAGGATATC
CCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCCA
GACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCTGAAGTCGGGCGCGG
GCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTCCGGCCACCCCCTGTACAACGCCA
GGACGACACCGAGAATAGCCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTC
CCGCGACAACGTCAGCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCAT
CGGGTTCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGCCAAGGGCAAGAGCT
GCAAGCCCACCAACGTGCAGCAGGGCGACTGCCCCCCTCTGGAGCTG
GTGAATACCCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGC
GCCATGGATTTCCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCCTG
GACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGC
GCCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAG
CTCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACCGCGGCGGCATGGTTCGGCGATGCA
ATCCCCGCACAGCTCTACATCAAGGGGACCGACATCCGCGCCAATCCA
GGCTCCAGCGTGTATTGTCCAAGCCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGC
GACAGCCAGCTGTTCAACAAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGG
CATAATAACGGCATCTGCTGGCACAACCAGCTGTTCCCTGACCGTCGTCC
ATACCACACGCTCCACAAATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAG
CATCCCCAGCACCTACGACCCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCA
CGTCGAAGAATACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACC
CTGACCACCGACGTCATGAGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCC
TCGATAACTGGAACCTTCGCCGTGGCCCCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCG
TGGATACCTATCGCTATCTGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGG
ACGCCCCCGCCCCGAGAAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCT
GGAACGTGATCTGCGCGAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCC
CCCTCGGCCGCAAGTTCCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCC
ACCATCGGCCACGCAAGCGCCCCGCCGCCAGCACCAGCAGCAGCAG
CGCCACCAAGCACAAGCGCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 19 (SEQ ID N°: 19):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTCACCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAGCAGGATATC
CCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCA
GACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTGAAGTCGGGCGCGG
GCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTCCGGCCACCCCTGTACAACGCCA
GGACGACACCGAGAATAGCCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTC
CCGCGACAACGTCAGCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCAT
CGGGTGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCT
GTAAGCCAAACAACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCTGGAGCTGG
TGAATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCG
CCATGGATTTCCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCTGG
ACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGCG
CCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAGC
TCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACAGAGGCGGCATGGTTCGGCGACACCA
TCCCCACCGACATGTACATCAAGGGCACCGACATCAGAGAGACACCCA
GCAGCTACGTGTACTGT
CCAAGCCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGCGACAGCCAGCTGTTCAAC
AAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGCATAATAACGGCATCTGC
TGGCACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTCGATACCACACGCTCCACAA
ATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAGCATCCCCAGCACCTACGA
CCCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCACGTCGAAGAATACGACCT
GCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCCTGACCACCGACGTCATG
AGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCTCGATAACTGGAACCTCG
CCGTGGCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCGTGGATACCTATCGCTATC
TGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGGACGCCCCCGCCCCGAG
AAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCTGGAACGTCGATCTGCGC
GAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCCCCCTCGGCCGCAAGTTC
CTCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCCACCATCGGCCACGCAA
GCGCCCCGCGCCAGCACCGAGCAGCAGCAGCGCCACCAAGCACAAGC
GCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 20 (SEQ ID N°: 20):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTCACCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAGCAGGATATC
CCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCA
GACCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCTGAAGTCGGGCGCGG
GCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTCCGGCCACCCCCTGTACAACGCCA
GGACGACACCGAGAATAGCCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTC
CCGCGACAACGTCAGCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCAT
CGGGTGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCT
GTAAGCCAAACAACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCTGGAGCTGG
TGAATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCG
CCATGGATTTCCGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCTGG
ACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGCG
CCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAGC
TCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACCGCGGGCGGCATGGTCCGGCGATGCAA
TCCCCGCACAGCTCTACATCAAGGGGACCGACATCCGCGCCAATCCAG
GCTCCAGCGTGTATTGTCCAAGCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGCG
ACAGCCAGCTGTTCAACAAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGC
ATAATAACGGCATCTGCTGGCACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTCTGA
TACCACACGCTCCACAAATTTACCCTGAGCACAAGCACCGACAGCACC
GTGCCCCGCGTGTACGACAGCAATAAGTTCAAGGAGTACACACGCCAC
GTCGAAGAATACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCC
TGACCACCGACGTCATGAGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCT
CGATAACTGGAACCTTCGCCGTGGCCCCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCGT
GGATACCTATCGCTATCTGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGGA
CGCCCCCGCCCCGAGAAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCTG
GAACGTCGATCTGCGCGAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCCC
CCTCGGCCGCAAGTTCCTCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCCCA
CCATCGGCCACGCAAGCGCCCCGCCGCCAGCACCAGCAGCAGCAGC
GCCACCAAGCACAAGCGCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 21 (SEQ ID N°: 21):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTACCCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTTAAGGTACCTGTAAATGGTGGCCGCAAGCAGGAAATAC
CTAAGGTGTCTGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCCAG
ACCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAGA
CCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCGAAGTCGGGCGCGG
GCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTCCGGCCACCCCTGTACAACGCCA
GGACGACACCGAGAATAGCCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTC
CCGCGACAACGTCAGCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCAT
CGGGTGCCTCCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCT
GTAAGCCAAACAACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCTGGAGCTGG
TGAATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCG
CCATGGATTTCCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCTGG
ACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGCG
CCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAGC
TCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACAGAGGCGGCATGGTTCGGCGACACCA
TCCCACCGACATGTACATCAAGGGCACCGACATCAGAGAGACACCCA
GCAGCTACGTGTACTGT
CCAAGCCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGCGACAGCCAGCTGTTCAAC
AAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGCATAATAACGGCATCTGC
TGGCACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTCGATACCACACGCTCCACAA
ATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAGCATCCCCAGCACCTACGA
CCCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCACGTCGAAGAATACGACCT
GCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCCTGACCACCGACGTCATG
AGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCTCGATAACTGGA ACTTCG
CCGTGGCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCGTGGATACCTATCGCTATC
TGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGGACGCCCCCGCCCCGAG
AAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCTGGAACGTCGATCTGCGC
GAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCCCCCTCGGCCGCAAGTTC
CTCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCCACCATCGGCCACGCAA
GCGCCCCGCGCCAGCACCGAGCAGCAGCAGCGCCACCAAGCACAAGC
GCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 22 (SEQ ID N°: 22):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTCACCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAGCAGGATATC
CCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCCA
GACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCTGAAGTCGGTAGAGG
CCAGCCATTGGGCGTTGGTGTAGTGGACATCCTTTATATAATAGATTG
GATGATACTGAAAATTCACATTTTTCTCTGCTGTTAATACACAGGACAG
TAGGGACAATGTGTCTGTGGACTATAAGCAGACCCAGCTCTGTATCATC
GGGTGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCTG
TAAGCCAAACAACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCCTGGAGCTGGT
GAATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCGC
CATGGATTTCCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCCTGGA
CATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGCGC
CGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAGCT
CTTCGCCCGCCACTTCTGGAACAGAGGGCGGCATGGTCCGGCGACACCAT
CCCCACCGACATGTACATCAAGGGCACCGACATCAGAGAGACACCCAG
CAGCTACGTGTAC
TGTCCAAGCCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGCGACAGCCAGCTGTTC
AACAAAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGCATAATAACGGCATC
TGCTGGCACAACCAGCTGTTCCCTGACCGTCGTCGATAACCACACGCTCC
ACAAATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAGCATCCCCAGCACCT
ACGACCCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCACGTCTGAAGAATACG
ACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCCTGACCACCGACGT
CATGAGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCTCGATAACTGGAAC
TTCGCCGTGGCCCCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCGTGGATACCTATCGC
TATCTGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGGACGCCCCCGCCCC
GAGAAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCTGGAACGTCTGATCTG
CGCGAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCCCCCTCGGCCGCAAG
TTCCTCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCCACCACCGGCCACG
CAAGCGCCCCGCCGCCAGCACCGAGCAGCAGCAGCGCCACCAAGCACA
AGCGCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 23 (SEQ ID N°: 23):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTACCCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAGCAGGATATC
CCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCA
GACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCTGAAGTCGGGCGCGG
GCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTCCGGCCACCCCTGTACAACGCCA
GGACGACACCGAGAATAGCCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTC
CCGCGACAACGTCAGCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCAT
CGGGTGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGCAAAGGGCAAGGCCT
GTAAGTCCACTACTGTACAACAGGGCGATTGTCCACCACTGGAGCTGGT
GAATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCGC
CATGGATTTCCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCCTGGA
CATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGCGC
CGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAGCT
CTTCGCCCGCCACTTCTGGAACAGAGGGCGGCATGGTCCGGCGACACCAT
CCCCACCGACATGTACATCAAGGGCACCGACATCAGAGAGACACCCAG
CAGCTACGTGTACTGT
CCAAGCCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGCGACAGCCAGCTGTTCAAC
AAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGCATAATAACGGCATCTGC
TGGCACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTCGATACCACACGCTCCACAA
ATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAGCATCCCCAGCACCTACGA
CCCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCACGTCGAAGAATACGACCT
GCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCCTGACCACCGACGTCATG
AGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCTCGATAACTGGA ACTTCG
CCGTGGCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCGTGGATACCTATCGCTATC
TGCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGGACGCCCCCGCCCCGAG
AAGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCTGGAACGTCGATCTGCGC
GAGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCCCCCTCGGCCGCAAGTTC
CTCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCCACCATCGGCCACGCAA
GCGCCCCGCGCCAGCACCCAGCAGCAGCAGCGCCACCAAGCACAAGC
GCAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 24 (SEQ ID N°: 24):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTCACCCGC
ACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGACCGTGGGC
CACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGCAAGCAGGATATC
CCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTTCCGCGTCACCCTCCA
GACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGCCAGCCTGTACAACCCCGAG
ACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCGTGGGCGTCTGAAGTCGGGCGCGG
GCAGCCCCTCGGCGTCGGCATCTCCGGCCACCCCTGTACAACGCCA
GGACGACACCGAGAATAGCCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTC
CCGCGACAACGTCAGCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCAT
CGGGTGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCT
GTAAGCCAAACAACGTGAGCACCGGCGATTGCCCCCCCTGGAGCTGG
TGAATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGCG
CCATGGATTTCCGGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCCCTGG
ACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCAGATGAGCG
CCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCGCCGCGAGCAGC
TCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACAGAGGCGGCATGGTTCGGCGACACCA
TCCCCACCGACATGTACATCAAGGGCACCGACATCAGAGAGACACCCA
GCAGCTACGTGTACTGT
CCAAGCCCATCCGGCAGCATGGTGACAAGCGACAGCCAGCTGTTCAAC
AAGCCCTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGCATAATAACGGCATCTGC
TGGCACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTCGATACCACACGCTCCACAA
ATTTACCCTGAGCACAAGCACCGAAACAGCCATACCTGCTGTATATAG
CCCTACAAAGTTCAAGGAGTACACACGCCACGTCTGAAGAATACGACCTG
CAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCCTGACCACCGACGTCATGA
GCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATCCTCGATAACTGGAAGTTTCGC
CGTGGCCCCCCCCCAGCGCATCCCTCGTGGATACCTATCGCTATCT
GCAGAGCGCCGCAATCACCTGCCAGAAGGACGCCCCCGCCCCGAGA
AGAAGGACCCCTACGATGGCCTGAAGTTCTGGAACGTCGATCTGCGCG
AGAAGTTCTCCCTGGAGCTGGACCAGTTCCCCCTCGGCCGCAAGTTCC
TCCTCCAGGCACGCGTGCGCCGCCGCCACCATCGGCCACGCAAG
CGCCCCGCCGCCAGCACCCAGCAGCAGCAGCGCCACCAAGCACAAGCG
CAAGCGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 25 (SEQ ID N°: 25):

TIPTDMYIKGTDIRETPSSY

Sequência 26 (SEQ ID N°: 26):

VSGHPLYNRLDDTENS HFSSAVNTQ

Sequência 27 (SEQ ID N°: 27):

AKGKACKSTTVQQ

Sequência 28 (SEQ ID N°: 28):

TETAIPAVYSPT

Sequência 29 (SEQ ID N°: 29):

MPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYAGSSRLLTVGHPYFKVGMNGGRKQ
DIPKVSAYQYRVFRVTL PDPNKFSIPDASLYNPETQRLVWACVGVEV
GRGQPLGVGISGHPLYNRQDDTENS PFSSTTNKDSRDNVSDYKQT
QLCIIGCVPAIGEHWGKGKACKPNNVSTGDCPPLELVNTPIEDGDMID
TGYGAMDFGALQETKSEVPLDICQSICKYPDYLQMSADVYGDSMFF
CLRREQLFARHFWRGGMVGD AIPAQLYIKGTDIRANPGSSVYCPSP
SGSMVTSDSQLFNKPYWLHKAQGHNNGICWHNQLFLT VVDTRSTN
FTLSTSIESSIPSTYDPSKFKEYTRHVEEYDLQFIFQLCTVTLT TDVMS
YIHTMNSSILDNWNFAVAPPPSASLVDTYRYLQSAAITCQKDAPAPEK
KDPYDGLKFWNVDLREKFSLELDQFPLGRKFLLQARVRRRPTIGPRK
RPAASTSSSSATKHKRKR VSK

Sequência 30 (SEQ ID N°: 30):

ATGCCAGCGTCGCCAAGGTCGTGAACACCGACGACTACGTCAC
CCGCACCGGGATCTACTACTACGCCGGGTCCAGCCGCCTGCTGA
CCGTGGGCCACCCCTACTTCAAGGTCGGCATGAACGGCGGGCGC
AAGCAGGATATCCCCAAGGTCAGCGCCTACCAGTACCGCGTGTT
CGCGTCACCCTCCAGACCCCAACAAGTTCTCCATCCCCGACGC
CAGCCTGTACAACCCCGAGACCCAGCGCCTGGTGTGGGCCTGCG
TGGGCGTCGAAGTCGGGCGCGGGCAGCCCCTCGGCGTCGGCAT
CTCCGGCCACCCCTGTACAACCGCCAGGACGACACCGAGAATA
GCCCTTCAGCAGCACAACAACAAGGATTCCCGCGACAACGTCA

GCGTCGACTACAAGCAGACCCAGCTCTGTATCATCGGGTGCGTC
CCAGCAATCGGCGAACACTGGGGCAAGGGCAAGGCCTGTAAGCC
AAACAACGTGAGCACCGGGCGATTGCCCCCCCTGGAGCTGGTGA
ATACACCCATCGAAGACGGCGACATGATCGACACCGGGTACGGC
GCCATGGATTTGCGCGCCCTCCAGGAGACAAAGTCCGAAGTCCC
CCTGGACATCTGCCAGAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTCCA
GATGAGCGCCGACGTCTACGGCGATTCCATGTTCTTCTGCCTGCG
CCGCGAGCAGCTCTTCGCCCGCCACTTCTGGAACCGCGGGCGGCA
TGGTCGGCGATGCAATCCCCGCACAGCTCTACATCAAGGGGACC
GACATCCGCGCCAATCCAGGCTCCAGCGTGTATTGTCCAAGCCCA
TCCGGCAGCATGGTGACAAGCGACAGCCAGCTGTTCAACAAGCC
CTACTGGCTGCACAAGGCACAGGGGCATAATAACGGCATCTGCT
GGCACAACCAGCTGTTCTGACCGTCGTCGATACCACACGCTCCA
CAAATTTACCCTGAGCACAAGCATCGAAAGCAGCATCCCCAGCA
CCTACGACCCCAGCAAGTTCAAGGAGTACACACGCCACGTGAA
GAATACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTCTGCACCGTGACCCTG
ACCACCGACGTCATGAGCTACATCCACACCATGAACAGCAGCATC
CTCGATAACTGGAACCTTCGCCGTGGCCCCCCCCCCCCAGCGCATC
CCTCGTGGATACCTATCGCTATCTGCAGAGCGCCGCAATCACCTG
CCAGAAGGACGCCCCCGCCCCGAGAAGAAGGACCCCTACGATG
GCCTGAAGTTCTGGAACGTGATCTGCGCGAGAAGTTCTCCCTGG
AGCTGGACCAGTTCCCCCTCGGCCGCAAGTTCCTCCTCCAGGCA
CGCGTGCGCCGCCGCCACCATCGGCCACGCAAGCGCCCCG
CCGCCAGCACCCAGCAGCAGCAGCGCCACCAAGCACAAGCGCAAG
CGCGTCAGCAAGTGA

Sequência 31 (SEQ ID N°: 31):

MVYLPPPSVAKVVNTDDYVTRTGIYYYAGSSRLLTVGHPYFKVPVNG
GRKQEIPKVSAYQYRVFRVSLPDPNKFGLPDPSTLYNPDTQRLVWACI
GVEIGRGQPLGVGVSGHPLYNRLDDTENSFSSAVNTQDSRDNVSV
DYKQTQLCIIGCVPAMGEHWAKGKACKSTTVQQGDCPPLELVNTAIE

DGDMIDTGYGAMDFRTLQETKSEVPLDICQSVCKYPDYLQMSADVY
GDSMFFCLRKEQLFARHFWRNRGGMVGDTIPSELYIKGTDIRDRPGTH
VYSPSPSGSMVSSDSQLFNKPYWLHKAQGHNNGICWHNQLFITVVD
TTRSTNFTLSACTETAIPAVYSPTKFKEYTRHVEEYDLQFIFQLCTITLT
ADVMAYIHTMNPAILDNWNIGVTPPPSASLVDYRYLQSAAIACQKDA
PAPEKKDPYDDLKFWNVLDLKEKFSTELDQFPLGRKFLLQVGARRRPT
IGPRKRPASAKSSSSASKHKRKRVS

Sequência 32 (SEQ ID N°: 32):

ATGGTGTATTTGCCACCCCCTTCTGTGGCGAAGGTTGTCAATACA
GATGATTATGTAACACGTACAGGCATATATTATTATGCTGGAAGCT
CTCGCTTATTAACAGTAGGGCATCCTTATTTTAAGGTACCTGTAAA
TGGTGGCCGCAAGCAGGAAATACCTAAGGTGTCTGCATATCAGTA
TAGGGTATTTAGGGTATCCCTACCTGATCCTAATAAGTTTGGCCTT
CCGGATCCTTCCCTTTATAATCCTGACACACAACGCCTGGTATGG
GCCTGTATAGGTGTGGAAATTGGTAGAGGCCAGCCATTGGGCGTT
GGTGTTAGTGGACATCCTTTATATAATAGATTGGATGATACTGAAA
ATTCACATTTTTCTCTGCTGTTAATACACAGGACAGTAGGGACAA
TGTGTCTGTGGACTATAAGCAGACACAGTTATGTATTATAGGCTGT
GTTCCCTGCTATGGGAGAGCACTGGGCAAAGGGCAAGGCCTGTAA
GTCCACTACTGTACAACAGGGCGATTGTCCACCATTAGAATTAGTT
AAACTGCAATTGAGGATGGCGATATGATAGATACAGGCTATGGA
GCCATGGACTTTCGTACATTGCAGGAAACCAAAGTGAGGTACCA
CTAGATATTTGCCAATCCGTGTGTAATATCCTGATTATTTGCAGA
TGTCTGCTGATGTATATGGGGACAGTATGTTTTTTTGTGGCGCAA
GGAACAGTTATTTGCCAGACACTTTTGAATAGAGGTGGCATGGT
GGGCGACACAATACCTTCAGAGTTATATATTAAGGCACGGATATA
CGTGATCGTCCTGGTACTCATGTATATTCCCCTTCCCCAAGTGGC
TCTATGGTTTCTTCTGATTCCCAGTTGTTTAATAAGCCCTATTGGTT
GCATAAGGCCCAGGGACACAATAATGGCATTGTTGGCATAACCA
GTTGTTTATTACTGTGGTGGACACTACACGTAGTACTAATTTTACA

TTGTCTGCCTGCACCGAAACAGCCATACCTGCTGTATATAGCCCT
ACAAAGTTTAAGGAATATACTAGGCATGTGGAGGAATATGATTTAC
AATTTATATTTTCAGTTGTGTACTATCACATTAAGTGCAGACGTTATG
GCCTACATCCATACTATGAATCCTGCAATTTTGGACAATTGGAATA
TAGGCGTTACCCCTCCACCATCTGCAAGCTTGGTGGACACGTATA
GGTATTTACAATCAGCAGCTATAGCATGTCAGAAGGATGCTCCTG
CACCTGAAAAAAGGATCCCTATGACGATTTAAAATTTTGGAAATGT
TGATTTAAAGGAAAAGTTTAGTACAGAACTAGATCAGTTTCCTTTG
GGCGCAAATTTTACTACAGGTAGGGGCTCGCAGACGTCCTACT
ATAGGCCCTCGCAAACGCCCTGCATCAGCTAAATCGTCTTCCTCA
GCCTCTAAACACAAACGGAAACGTGTGTCCAAGTAA

Sequência 33 (SEQ ID N°: 33):

PMSGGRKQG

Sequência 34 (SEQ ID N°: 34):

LSGHPLYNRLDDTENSFPSSNKNPKDSRDNVAVDC

Sequência 35 (SEQ ID N°: 35):

AKGKSCKPTNVQQ

Sequência 36 (SEQ ID N°: 36):

TDSTVPAVYDSN

Sequência 37 (SEQ ID N°: 37):

PVNGGRKQE

Modos Específicos para Realização da Invenção

[0077] A presente invenção é descrita mais com referência aos exemplos como segue, em que os exemplos são usados apenas para o propósito de ilustração da presente invenção, ao invés de limitação da presente invenção.

[0078] A menos que de outro modo indicado, os métodos biológicos moleculares experimentais e ensaios imunológicos usados na presente invenção são realizados substancialmente de acordo com os métodos como descrito em Sambrook, J. e outros, *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual (Segunda Edição), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 e F. M. Ausubel e outros, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edição, John Wiley & Sons, Inc., 1995; e enzimas de restrição são usadas sob as condições recomendadas pelos fabricantes. Aqueles versados na técnica compreendem que os exemplos são usados para ilustração da presente invenção, mas não pretendidos limitar o escopo da proteção da presente invenção.

Exemplo 1. Expressão e purificação das proteínas L1 de HPV39 mutadas

Construção de Vetores de Expressão

[0079] Um vetor de expressão codificando a proteína L1 de HPV39 mutada compreendendo um segmento de proteína L1 de HPV68 foi construído através de PCR para mutagênese de sítios múltiplos, em que o modelo inicial usado era o plasmídeo pTO-T7-HPV39N15C (codificando a proteína L1 de HPV39 tendo 15 aminoácidos truncada no terminal N; abreviada como 39L1N15 na Tabela 2. Os modelos e *primers* para cada PCR foram mostrados na Tabela 2, e as condições de amplificação para PCR foram como segue: desnaturação a 94°C por 10 min; 25 ciclos (desnaturação a 94°C por 50 seg, anelamento em uma dada temperatura por um certo período de tempo e extensão a 72°C por 7,5 min); e extensão final a 72°C por 10 min. A temperatura e o tempo de anelamento foram listados na Tabela 2. As sequências dos *primers* de PCR usados foram listadas na Tabela 3.

[0080] Ao produto de amplificação (50 µL), 2 µL de endonuclease de restrição DpnI (Fermentas (MBI), No. Cat. FD1704, 2500U/tubo) foram adicionados, e a mistura resultante foi incubada a 37°C por 60 min. 10 µL do produto de digestão foram usados para transformar 40 µL de ER2566 de *E. coli* competente (comprado da New England Biolabs) preparada através do método de Cloreto de cálcio. A *E. coli* transformada foi espalhada em meio LB sólido (os componentes do

meio LB: 10 g/L de peptona, 5 g/L de levedura em pó, 10 g/L de NaCl, o mesmo abaixo) contendo canamicina (em uma concentração final de 25 µg/mL, o mesmo abaixo), e foi submetida à cultura estática a 37°C por 10-12 horas até que colônias únicas pudessem ser observadas claramente. Colônia única foi pega e inoculada em um tubo contendo 4 mL de meio LB líquido (contendo canamicina), e cultivada com agitação a 220 rpm por 10 horas a 37°C, e então 1 ml de solução bacteriana foi pego e armazenado a -70°C. Plasmídeos foram extraídos de *E. coli*, e *primer* T7 foi usado para sequenciar as sequências de nucleotídeo dos fragmentos de interesse inseridas nos plasmídeos. O resultado de sequenciamento mostrou que a sequência de nucleotídeo dos fragmentos de interesse inseridas nos plasmídeos construídos (vetores de expressão) era SEQ ID N°: 16, e sua sequência de aminoácido codificada era SEQ ID N°: 4 (a proteína correspondente foi designada como H39N15-68T1). A proteína mutada H39N15-68T1 difere de HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 53-61 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 53-61 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem.

[0081] A montagem Gibson (Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 2009;6:343-5. doi: 10.1038/nmeth.1318) foi usada para construir o vetor de expressão codificando a outra proteína L1 de HPV39 mutada, em que a proteína L1 de HPV39 mutada compreendia um segmento específico de L1 de HPV68 e um segmento específico de L1 de HPV70. Em suma, um fragmento curto compreendendo mutações e um fragmento longo não compreendendo nenhuma mutação foram obtidos através de PCR, e sistema de montagem Gibson foi então usado para ligar os dois fragmentos para formar um anel. O modelo inicial usado compreendia o

plasmídeo pTO-T7-HPV39N15 (codificando a proteína L1 de HPV39 tendo 15 aminoácidos truncados no terminal N; abreviada como 39L1N15 na Tabela 2), o plasmídeo pTO-T7-HPV68L1 (codificando a proteína L1 de HPV68; abreviada como 68L1N0 na Tabela 2), o plasmídeo pTO-T7-H39N15-68T4 (codificando a proteína mutada H39N15-68T4; abreviada como H39N15-68T4 na Tabela 2) e o plasmídeo pTO-T7-HPV70N10 (codificando a proteína HPV70 L1 tendo 10 aminoácidos truncados no terminal N; abreviada como 70L1N10 na Tabela 2). Os modelos e *primers* para cada PCR foram mostrados na Tabela 2, e as condições de amplificação para PCR para amplificação do fragmento curto foram como segue: 94°C por 10 min; 25 ciclos (desnaturação a 94°C por 50 seg, anelamento em uma dada temperatura por um certo período de tempo, e extensão a 72°C por 1 min); e extensão final a 72°C por 10 min. As condições de amplificação para PCR para amplificação do fragmento longo foram como segue: desnaturação a 94°C por 10 min; 25 ciclos (desnaturação a 94°C por 50 seg, anelamento em uma dada temperatura por um certo período de tempo e extensão a 72°C por 7,5 min); e extensão final a 72°C por 10 min. As sequências dos *primers* de PCR usadas foram listadas na Tabela 3. O produto de amplificação foi submetido à eletroforese, o fragmento de interesse foi então recuperado usando DNA Extraction Kit (BEYOTIME, No. Cat. D0033), e sua concentração foi determinada. O fragmento curto e o fragmento longo obtidos através de amplificação foram misturados em uma razão molar de 2:1 (um volume total de 3 µL) e 3 µL de 2 X Gibson Assembly Master Mix (comprado da NEB, contendo exonuclease T5, polimerase de DNA Phusion, ligase de DNA Taq) foram então adicionados, e reagidos a 50°C por uma hora.

[0082] O produto montado (6 µL) foi usado para transformar 40 µL de ER2566 de *E. coli* competente (comprado da New England Biolabs) preparado através do método de Cloreto de cálcio. As *E. coli*

transformadas foram espalhadas em meio LB sólido contendo canamicina e foram submetidas à cultura estática a 37°C por 10-12 horas até que colônias únicas pudessem ser observadas claramente. Colônia única foi pega e inoculada em um tubo contendo 4 mL de meio LB líquido (contendo canamicina) e cultivada com agitação a 220 rpm por 10 horas a 37°C, e então 1 mL de solução bacteriana foi pegado e armazenado a -70°C. Os plasmídeos foram extraídos de *E. coli*, e *primer* T7 foi usado para sequenciar as sequências de nucleotídeo dos fragmentos de interesse inseridos nos plasmídeos. O resultado do sequenciamento mostrou que as sequências de nucleotídeo dos fragmentos de interesse inseridos nos plasmídeos construídos (vetores de expressão) eram SEQ ID N^{os}: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24, respectivamente, e suas sequências de aminoácido codificadas eram SEQ ID N^{os}: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente (as proteínas correspondentes foram designadas como H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5, respectivamente).

[0083] A proteína mutada H39N15-68T2 difere de HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 117-150 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 117-151 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem. A proteína mutada H39N15-68T3 difere da HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 169-181 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 170-182 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem. A proteína mutada H39N15-68T4 difere da HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 269-288 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido de posições 207-289 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem. A proteína mutada

H39N15-68T5 difere de HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 347-358 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 348-359 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem.

[0084] A proteína mutada H39N15-68T4-70S1 difere da HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 269-288 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 270-289 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem, e substituição dos resíduos de aminoácido das posições 53-61 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 53-61 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem. A proteína mutada H39N15-68T4-70S2 difere da HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 269-288 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 270-289 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem e substituição dos resíduos de aminoácido das posições 117-140 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 117-141 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem. A proteína mutada H39N15-68T4-70S3 difere da HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 269-288 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 270-289 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem e substituição dos resíduos de aminoácido das posições 169-181 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 170-182 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem. A proteína mutada H39N15-68T4-70S5 difere da HPV39N15 pela: substituição dos resíduos de aminoácido das posições 269-288 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 270-289 de proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem e a substituição dos resíduos de aminoácido das posições 347-358 de

proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com os resíduos de aminoácido das posições 348-359 de proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem.

Tabela 2. Modelos de PCR e *primers* para construção de vetores de expressão

Modelo	<i>Primer</i> a montante	<i>Primer</i> a jusante	Produto	Temperatura/ Tempo de anelamento
39L1N15	H39N15-68T1-F	H39N15-68T1-R	H39N15-68T1	56°C/50s
39L1N15	G-V-H39N15-68T2-F	G-V-H39N15-68T2-R	fragmento longo H39N15-68T2	56°C/50s
39L1N15	G-V-H39N15-68T3-F	G-V-H39N15-68T3-R	fragmento longo H39N15-68T3	56°C/50s
39L1N15	G-V-H39N15-68T4-F	G-V-H39N15-68T4-R	fragmento longo H39N15-68T4	56°C/50s
39L1N15	G-V-H39N15-68T5-F	G-V-H39N15-68T5-R	fragmento longo H39N15-68T5	56°C/50s
68L1N0	G-H39N15-68T2-F	G-H39N15-68T2-R	fragmento curto H39N15-68T2	56°C/30s
68L1N0	G-H39N15-68T3-F	G-H39N15-68T3-R	fragmento curto H39N15-68T3	56°C/30s
68L1N0	G-H39N15-68T4-F	G-H39N15-68T4-R	fragmento curto H39N15-68T4	56°C/30s
68L1N0	G-H39N15-68T5-F	G-H39N15-68T5-R	fragmento curto H39N15-68T5	56°C/30s
H39N15-68T4	G-V-H39N15-68T4-70S1-F	G-V-H39N15-68T4-70S1-R	fragmento longo H39N15-68T4-70S1	56°C/50s
H39N15-68T4	G-V-H39N15-68T4-70S2-F	G-V-H39N15-68T4-70S2-R	fragmento longo H39N15-68T4-70S2	56°C/50s
H39N15-68T4	G-V-H39N15-68T4-70S3-F	G-V-H39N15-68T4-70S3-R	fragmento longo H39N15-68T4-70S3	56°C/50s
H39N15-68T4	G-V-H39N15-68T4-70S5-F	G-V-H39N15-68T4-70S5-R	fragmento longo H39N15-68T4-70S5	56°C/50s
70L1N10	G-H39N15-68T4-70S1-F	G-H39N15-68T4-70S1-R	fragmento curto H39N15-68T4-70S1	56°C/30s
70L1N10	G-H39N15-68T4-70S2-F	G-H39N15-68T4-70S2-R	fragmento curto H39N15-68T4-70S2	56°C/30s
70L1N10	G-H39N15-68T4-70S3-F	G-H39N15-68T4-70S3-R	fragmento curto H39N15-68T4-70S3	56°C/30s
70L1N10	G-H39N15-68T4-70S5-F	G-H39N15-68T4-70S5-R	fragmento curto H39N15-68T4-70S5	56°C/30s

Tabela 3. Sequências dos *primers* usados (SEQ ID N^{os}: 38-71)

SEQ ID N ^o :	Nome do <i>primer</i>	Sequência de <i>primer</i> (5'-3')
38	H39N15-68T1-F	TTCAAGGTCCCATGAGCGGGCGCAAGCAGGATATCCCCAAGGTC
39	H39N15-68T1-R	CCCGCCGCTCATGGGGACCTTGAAGTAGGGGTGGCCACGGTCAGCAG
40	G-V- H39N15-68T2-F	GACTTCGACGCCACGCAGGCCCA
41	G-V- H39N15-68T2-R	AAGCAGACCCAGCTCTGTATCATC
42	G-V- H39N15-68T3-F	TTCGCCGATTGCTGGGACGCACCC
43	G-V- H39N15-68T3-R	CTGGAGCTGGTGAATACACCCATC
44	G-V- H39N15-68T4-F	GTGGCGGGCGAAGAGCTGCTCGCG
45	G-V- H39N15-68T4-R	TGTCCAAGCCCATCCGGCAGCATG
46	G-V- H39N15-68T5-F	GCTTGTGCTCAGGGTAAAATTTGTGGAGCG
47	G-V- H39N15-68T5-F	TTCAAGGAGTACACAGCCACGTCAAGAA
48	G- H39N15-68T2-F	TGGGCCTGCGTGGGCGTGAAGTCGGCAGAGGCCAGCCCCCTGGGC
49	G- H39N15-68T2-R	GATGATACAGAGCTGGGTCTGCTTGCAGTCCACGGCCACGTTGTC
50	G- H39N15-68T3-F	GGGTGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGCCAAGGGCAAGAGC
51	G- H39N15-68T3-R	GATGGGTGTATTCACCAGCTCCAGAGGGGGCAGTCGCCCTGCTG
52	G- H39N15-68T4-F	CGCGAGCAGCTTTCGCCCGCCACTTCTGGAACAGAGGCGGCATG
53	G- H39N15-68T4-R	CATGCTGCCGATGGGCTTGGACAGTACACGTAGCTGCTGGGTGT
54	G- H39N15-68T5-F	CGTCCACAAATTTACCCTGAGCACAAGCACCGACAGCACCGTGCCCGCC
55	G- H39N15-68T5-R	TTCTTCGACGTGGCGTGTACTCCTTGAACCTATTGCTGTCGTACACGGC
56	G-V- H39N15-68T4-70S1-F	GTAGGGGTGGCCACGGTCAG
57	G-V- H39N15-68T4-70S1-R	GCCTACCAGTACCGCGTGTTC
58	G-V- H39N15-68T4-70S2-F	GACTTCGACGCCACGCAGGC
59	G-V- H39N15-68T4-70S2-R	AAGCAGACCCAGCTCTGTATC
60	G-V- H39N15-68T4-70S3-F	TTCGCCGATTGCTGGGACGCA
61	G-V- H39N15-68T4-70S3-R	CTGGAGCTGGTGAATACACCC
62	G-V- H39N15-68T4-70S5-F	GCTTGTGCTCAGGGTAAAAT
63	G-V- H39N15-68T4-70S5-R	TTCAAGGAGTACACAGCCAC
64	G- H39N15-68T4-70S1-F	CTGACCGTGGGCCACCCCTACTTTAAGGTACCTGTAATGGT
65	G- H39N15-68T4-70S1-R	GAACACGCGGTACTGGTAGGCAGACACCTTAGGTATTTCTG
66	G- H39N15-68T4-70S2-F	GCCTGCGTGGGCGTGAAGTCGGTAGAGGCCAGCCATTGGGC
67	G- H39N15-68T4-70S2-R	GATACAGAGCTGGGTCTGCTTATAGTCCACAGACACATTGTC
68	G- H39N15-68T4-70S3-F	TGCGTCCCAGCAATCGGCGAACACTGGGCCAAGGGCAAGGCC
69	G- H39N15-68T4-70S3-R	GGGTGTATTCACCAGCTCCAGTGGTGGACAATCGCCCTGTTGTAC
70	G- H39N15-68T4-70S5-F	AATTTACCCTGAGCACAAGCACCGAAACAGCCATACCTGCT
71	G- H39N15-68T4-70S5-R	GTGGCGTGTACTCCTTGAACCTTTGTAGGGCTATATACAGC

Expressão das proteínas mutadas em uma grande escala

[0085] As soluções de *E. coli* compreendendo os plasmídeos recombinantes pTO-T7-H39N15-68T1, pTO-T7- H39N15-68T2, pTO-T7-H39N15-68T3, pTO-T7-H39N15-68T4, pTO-T7-H39N15-68T5, pTO-T7-H39N15-68T4-70S1, pTO-T7-H39N15-68T4-70S2, pTO-T7-H39N15-68T4-70S3 e pTO-T7-H39N15-68T4-70S5, respectivamente, foram obtidas de refrigerador a -70°C, foram inoculadas em 100 mL de meio líquido LB contendo canamicina e incubadas a 200 rpm e 37°C por cerca de 8 h. Então, a cultura foi transferida para 500 mL de meio LC contendo canamicina (1 ml de solução bacteriana foi transferido) e foi incubada mais. Quando a concentração bacteriana atingiu um OD600 de cerca de 0,6, a temperatura da cultura foi diminuída para 25°C e 500 µL de IPTG foram adicionados a cada garrafa de cultura. A incubação foi realizada ainda por 8 h. Após a incubação ter terminado, as bactérias foram coletadas através de centrifugação. As bactérias expressando as proteínas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 foram obtidas, respectivamente.

Rompimento de bactérias expressando as proteínas mutadas

[0086] As bactérias obtidas foram ressuspensas em uma razão de 1 g de bactéria para 10 mL de tampão de lise (tampão de Tris 20 mM, pH 7,2, NaCl 300 mM). As bactérias foram rompidas usando um aparelho ultrassônico por 30 min. A solução de lise contendo as bactérias rompidas foi centrifugada a 13500 rpm (30000 g) por 15 minutos, e o sobrenadante (isto é, o sobrenadante de bactérias rompidas) foi obtido.

Purificação cromatográfica da proteína mutada

[0087] Equipamento: sistema de cromatografia líquida preparativa AKTA Explorer 100 produzido pela GE Healthcare (isto é, a original Amershan Pharmacia Co.).

[0088] Meios cromatográficos: SP Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Co.), CHT-II (comprador da Bio-RAD) e Butyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Co.).

[0089] Tampão: Tampão A (tampão de fosfato 20 mM, pH 8,0, DTT 20 mM); e Tampão B (tampão de fosfato 20 mM, pH 8,0, DTT 20 mM, NaCl 2 M). Os tampões contendo concentrações de NaCl diferentes usados no protocolo de eluição que seguem foram preparados misturando o Tampão A e o Tampão B em uma certa razão.

[0090] Amostra: os sobrenadantes de bactérias rompidas contendo H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5, respectivamente, conforme obtido acima.

Protocolo de Eluição:

[0091] (1) Purificação por troca catiônica do sobrenadante de bactérias rompidas através de SP Sepharose 4 Fast Flow: a amostra foi carregada na coluna, proteínas indesejadas foram então eluídas com um tampão contendo NaCl 400 mM (Tampão A 80% + Tampão B 20%), seguido pela eluição da proteína de interesse com um tampão contendo NaCl 800 mM (Tampão A 60% + Tampão B 40%), e a fração eluída com o tampão contendo NaCl 800 mM foi coletada;

(2) Purificação cromatográfica da fração de eluição obtida na etapa (1) por CHTII (cromatografia de hidroxapatita): a fração de eluição obtida na etapa (1) foi diluída de modo que a concentração de NaCl foi diminuída para 0,5 M; a amostra foi carregada na coluna, proteínas indesejadas foram então eluídas com um tampão contendo NaCl 500 mM (Tampão A 75% + Tampão B 25%), seguido pela eluição da proteína de interesse com um tampão contendo NaCl 1000 mM (Tampão B 50% + Tampão B 50%), e a fração eluída com o tampão contendo NaCl 100 mM foi coletado;

(3) Purificação cromatográfica da fração de eluição obtida

na etapa (2) através de HIC (cromatografia de interação hidrofóbica): a amostra foi carregada na coluna, proteínas indesejadas foram então eluídas com um tampão contendo NaCl 1000 mM, seguido pela eluição da proteína de interesse com um tampão contendo NaCl 200 mM (Tampão A 90% + Tampão B 10%), e a fração eluída com o tampão contendo NaCl 200 mM foi coletada.

[0092] 150 µL de fração de eluição obtida na etapa (3) foram adicionados a 30 µL de Tampão de Carregamento 6x (1L do qual continha 300 ml de TB 6.8 1M, 600 ml de glicerol 100%, 120 g de SDS, 6 g de azul de bromofenol e 50 ml de β-mercaptoetanol). A solução resultante foi misturada bem e incubada em banho de água a 80°C por 10 min. 10 µl da amostra resultante foram então submetidos a SDS-PAGE 10% a 120V por 120 min; e as faixas eletroforéticas foram tingidas com azul de Coomassie brilhante. O resultado eletroforético foi mostrado na Figura 1. O resultado mostrou que após as ditas etapas de purificação, as proteínas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 tinham uma pureza acima de 90%.

[0093] Através de métodos similares, a proteína HPV39N15 foi preparada e purificada usando *E. coli* e o plasmídeo pTO-T7-HPV39N15; a proteína HPV68N0 foi preparada e purificada usando *E. coli* e o plasmídeo pTO-T7-HPV68L1N0; e a proteína HPV70N10 foi preparada e purificada usando *E. coli* e o plasmídeo pTO-T7-HPV70N10.

Ensaio *Western blot* das proteínas mutadas

[0094] As proteínas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 purificadas através do método acima foram submetidas à eletroforese. Após eletroforese,

ensaio *Western blot* foi realizado usando um anticorpo de amplo espectro 4B3 contra proteína L1 de HPV, e o resultado foi mostrado na Figura 2. O resultado mostrou que H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 poderiam ser especificamente reconhecidas pelo anticorpo de amplo espectro 4B3.

Exemplo 2: montagem de partículas do tipo vírus HPV e detecção morfológica de partículas

Montagem de partículas do tipo vírus HPV

[0095] Um dado volume (cerca de 2 ml) da proteína H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 ou H39N15-68T4-70S5 foi dialisado para (1) 2 L de tampão de armazenamento (tampão de fosfato de sódio 20 mM pH 6,5, NaCl 0,5 M); (2) 2L de tampão de renaturação (tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 6,0, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 0,5 M); e (3) tampão de fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, NaCl 0,5 M, sucessivamente. A diálise foi realizada em cada um dos três tampões por 12 horas.

[0096] Através de métodos similares, as proteínas HPV39N15, HPV68N0 e HPV70N10 foram montadas em VLP HPV39N15, VLP HPV68N0 e VLP HPV70N10, respectivamente.

Análise cromatográfica de peneira molecular

[0097] A amostra dialisada foi submetida à análise cromatográfica de peneira molecular através do 1120 Compact LC High Performance Liquid Chromatographic System (Agilent Technologies), em que a coluna analítica usada foi TSK Gel PW5000xl 7,8x300 mm. Os resultados de análise foram mostrados nas Figuras 3 e 4. Os resultados mostraram que o primeiro pico de proteína das amostras compreendendo a proteína H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-

68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 ou H39N15-68T4-70S5 apareceu em cerca de 13-14 min, que era comparável àquele de HPV39N15 VLP, HPV68N0 VLP e HPV70N10 VLP. Isso mostrou que todas essas proteínas eram capazes de se reunir em VLPs.

Análise de Velocidade de Sedimentação

[0098] O aparelho para análise de velocidade de sedimentação foi Beckman XL-A Analytical Ultracentrifuge, equipado com sistema de inspeção óptica e rotor An-50Ti e An-60Ti. Os coeficientes de sedimentação de HPV39N15 VLP, HPV68N0 VLP, HPV70N10 VLP, H39N15-68T1 VLP, H39N15-68T2 VLP, H39N15-68T3 VLP, H39N15-68T4 VLP, H39N15-68T5 VLP, H39N15-68T4-70S1 VLP, H39N15-68T4-70S2 VLP, H39N15-68T4-70S3 VLP e H39N15-68T4-70S5 VLP foram analisados através de método de velocidade de sedimentação. Os resultados foram mostrados nas Figuras 5A-5L. Os resultados mostraram que o coeficiente de sedimentação de VLP H39N15-68T1, VLP H39N15-68T2, VLP H39N15-68T3, VLP H39N15-68T4, VLP H39N15-68T5, VLP H39N15-68T4-70S1, VLP H39N15-68T4-70S2, VLP H39N15-68T4-70S3 e VLP H39N15-68T4-70S5 foi 136S, 151S, 138S, 145S, 135S, 124S, 108S, 99S e 127S, respectivamente. Isso mostrou que as proteínas mutadas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 preparadas acima foram capazes de se reunir em partículas do tipo vírus que eram similares à VLP do tipo selvagem (VLP HPV39N15, 115S; VLP HPV68N0, VLP 153S; HPV70N10, 144S) em termos de tamanho e morfologia.

Teste morfológico de partículas do tipo vírus

[0099] Uma amostra de 100 µL compreendendo VLP foi observada através de microscópio eletrônico de transmissão (TEM). O aparelho

usou um Microscópio Eletrônico de Transmissão de 100 kV fornecido pela JEOL Ltd. (ampliação de 100.000x). Em suma, 13,5 µL de amostra foram negativamente tingidos com ácido fosfotúngstico 2% (pH 7,0), fixados em uma grade de cobre revestida com carbono, e então observados através de TEM. Os resultados foram mostrados nas Figuras 6A-6L. Os resultados mostraram que as proteínas mutadas H39N15-68T1, H39N15-68T2, H39N15-68T3, H39N15-68T4, H39N15-68T5, H39N15-68T4-70S1, H39N15-68T4-70S2, H39N15-68T4-70S3 e H39N15-68T4-70S5 foram capazes de se reunir em partículas do tipo vírus, e as partículas do tipo vírus reunidas através dessas proteínas mutadas eram uniformes em tamanho, e tinham um raio de cerca de 25-30 nm. As partículas do tipo vírus reunidas pelas HPV39N15, HPV68N0 e HPV70N10 do tipo selvagem também tinham um raio de cerca de 25-30 nm, e eram de tamanho uniforme. Isso indicou que essas proteínas mutadas eram similares à proteína L1 de HPV39, HPV68 e HPV70 do tipo selvagem, e foram capazes de se reunir em VLPs com um tamanho uniforme.

Exemplo 3: avaliação 1 de título de anticorpo de neutralização em soro de camundongos vacinados com partículas do tipo vírus

[0100] Nesse experimento, partículas do tipo vírus usadas foram VLP H39N15-68T1, VLP H39N15-68T2, VLP H39N15-68T3, VLP H39N15-68T4 e VLP H39N15-68T5.

[0101] Nesse experimento, programa de vacinação foi mostrado na Tabela 4. Todos os camundongos (camundongos fêmeas BalB/c de 6 semanas de vida) foram divididos em 3 grupos: grupo 1 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 5 µg, usando adjuvante de alumínio), grupo 2 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 1 µg, usando adjuvante de alumínio) e grupo 3 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 0,2 µg, usando adjuvante de alumínio). Cada grupo foi dividido mais em 8 subgrupos.

Os subgrupos de controle 1 e 2 foram vacinados com VLP HPV39N15 sozinha e VLP de HPV68N0 sozinha, respectivamente. O subgrupo controle 3 foi vacinado com a VLP de HPV39/HPV68 mista (isto é, uma mistura de VLP de HPV39N15 e VLP de HPV68N0, em uma dada dose de imunização para cada VLP). Os subgrupos experimentais 1, 2, 3, 4 e 5 foram vacinados com VLP de H39N15-68T1, VLP de H39N15-68T2, VLP de H39N15-68T3, VLP de H39N15-68T4 e VLP de H39N15-68T5, respectivamente.

[0102] Em grupos 1-3 de Adjuvante de alumínio, 5 camundongos/subgrupo foram vacinados através de injeção intraperitoneal, em uma dose de imunização de 5 µg, 1 µg e 0,2 µg, respectivamente, e um volume de injeção de 1 mL. Todos os camundongos foram submetidos à primeira vacinação na Semana 0, e então submetidos à vacinação de reforço nas Semanas 2 e 4, respectivamente. Na Semana 8, amostra de sangue foi coletada por meio de sangramento orbital, e os títulos de anticorpos contra HPV39 e HPV68 em soro foram analisados. Os resultados de análise foram mostrados nas Figuras 7A-7C. Os resultados mostraram que VLP H39N15-68T4 poderia induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV39 em camundongos, e seu efeito protetor foi ligeiramente mais fraco do que aquele de VLP HPV39N15 sozinha na mesma dose, mas foi significativamente superior àquele de VLP de HPV68N0 sozinha na mesma dose; e ela foi capaz de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV68 em camundongos, e seu efeito protetor foi ligeiramente mais fraco do que aquele de VLP de HPV68N0 sozinha na mesma dose, mas foi significativamente superior àquele de VLP de HPV39N15 sozinha na mesma dose. Isso mostrou que VLP de H39N15-68T4 tinha imunogenicidade cruzada e proteção cruzada boas contra HPV39 e HPV68.

Tabela 4. Programa de Vacinação

Grupo	Antígeno para Vacinação	Adjuvante	Dose de imunização	Número	Procedimento de vacinação (semana)
Grupo 1 de Adjuvante de alumínio	HPV39N15 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	HPV68N0 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	A VL de HPV39/HPV68 mista	adjuvante de alumínio	5µg para cada VLP	5	0, 2, 4
	H39N15-68T1 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T2 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T3 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
Grupo 2 de Adjuvante de alumínio	HPV39N15 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	HPV68N0 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	A VLP de HPV39/HPV68 mista	adjuvante de alumínio	1µg para cada VLP	5	0, 2, 4
	H39N15-68T1 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T2 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T3 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
Grupo 3 de Adjuvante de alumínio	HPV39N15 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	HPV68N0 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	The mixed HPV39/HPV68 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg para cada VLP	5	0, 2, 4
	H39N15-68T1 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T2 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T3 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
H39N15-68T5 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4	

Exemplo 4: avaliação 1 de ED₅₀ de partículas do tipo vírus para indução de soroconversão

[0103] Nesse experimento, a partícula do tipo vírus usada foi VLP H39N15-68T4.

[0104] Camundongos fêmeas BalB/c de 6 semanas de vida (8 camundongos) foram vacinados com adjuvante de alumínio através de injeção intraperitoneal, em que VLP de H39N15-68T4 (em uma dose de imunização de 0,900µg, 0,300µg, 0,100µg, 0,033µg ou 0,011µg) foi usada nos Grupos experimentais, e VLP de HPV68N0 sozinha (em uma dose de imunização de 0,900µg, 0,300µg, 0,100µg, 0,033µg ou 0,011µg), VLP de HPV39N15 sozinha (em uma dose de imunização de 0,900µg, 0,300µg, 0,100µg, 0,033µg ou 0,011µg) ou a VLP de HPV39/HPV68 mista (i.e., uma mistura de VLP de HPV39N15 e VLP de HPV68N0, em uma dose de imunização de 0,900µg, 0,300µg, 0,100µg, 0,033µg ou 0,011µg para cada VLP); o volume de imunização foi 1 mL. Ainda, o diluente usado para diluir a vacina foi usado como um controle em branco. 8 camundongos foram vacinados em cada grupo, e na Semana 5 após vacinação, sangue venoso foi coletado do globo ocular. Anticorpos contra HPV no soro foram detectados, e através do método Reed-Muench (Reed, L.J. M.H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938; 27:493-7), ED₅₀ para indução de soroconversão (isto é, indução da geração de anticorpos em camundongos) foi calculada para cada amostra. Os resultados foram mostrados nas Tabela 5-8.

Tabela 5. ED₅₀ de VLP de HPV39N15 para indução da geração de anticorpos contra HPV39 e HPV68 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	8	100,00%	0,019
	0,300	8	8	100,00%	
	0,100	8	6	88,89%	
	0,033	8	8	83,33%	
	0,011	8	2	20,00%	
HPV68	0,900	8	0	0,00%	>0,9
	0,300	8	0	0,00%	
	0,100	8	0	0,00%	
	0,033	8	0	0,00%	
	0,011	8	8	0,00%	

Tabela 6. ED₅₀ de VLP de HPV680 para indução da geração de anticorpos contra HPV39 e HPV68 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	0	0,00%	>0,9
	0,300	8	0	0,00%	
	0,100	8	0	0,00%	
	0,033	8	0	0,00%	
	0,011	8	0	0,00%	
HPV68	0,900	8	8	100,00%	0,021
	0,300	8	8	100,00%	
	0,100	8	7	93,75%	
	0,033	8	7	80,00%	
	0,011	8	1	10,00%	

Tabela 7. ED₅₀ de VLP de H39N15-68T4 para indução da geração de anticorpos contra HPV39 e HPV68 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	6	90,48%	0,091
	0,300	8	6	76,47%	
	0,100	8	6	53,85%	
	0,033	8	1	7,14%	
	0,11	8	0	0,00%	
HPV68	0,900	8	4	75,00%	0,300
	0,300	8	4	50,00%	
	0,100	8	2	22,22%	
	0,033	8	2	9,09%	
	0,011	8	0	0,00%	

Tabela 8. ED₅₀ de VLP de HPV39 /HPV68 para indução da geração de anticorpos contra HPV39 e HPV68 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	7	97,06%	0,017
	0,300	8	8	96,30%	
	0,100	8	8	94,74%	
	0,033	8	8	90,91%	
	0,011	8	2	22,22%	
HPV68	0,900	8	7	96,88%	0,021
	0,300	8	8	96,00%	
	0,100	8	8	94,12%	
	0,033	8	7	80,00%	
	0,011	8	1	10,00%	

[0105] Os resultados mostraram que 5 semanas após a vacinação dos camundongos, a ED₅₀ de VLP de H39N15-68T4 para indução da geração de anticorpos contra HPV39 em camundongos era comprável àquela de VLP de HPV39N15 sozinha, e foi significativamente superior àquela de VLP de HPV68N0 sozinha; e sua ED₅₀ para indução da geração de anticorpos contra HPV68 foi ligeiramente mais fraca do que aquela de VLP de HPV68N0 sozinha, mas foi significativamente superior àquela de VLP de HPV39N15 sozinha. Isso mostrou que VLP de H39N15-68T4 tinha imunogenicidade cruzada e proteção cruzada boas contra HPV68 e HPV39.

Exemplo 5: avaliação 2 de título de anticorpo de neutralização em soro de camundongos vacinados com partículas do tipo vírus

[0106] Nesse experimento, as partículas do tipo vírus usadas foram VLP de H39N15-68T4-70S1, VLP de H39N15-68T4-70S2, VLP de H39N15-68T4-70S3 e VLP de H39N15-68T4-70S5.

[0107] Nesse experimento, o programa de vacinação foi mostrado na Tabela 9. Todos os camundongos (camundongos fêmeas BalB/c de 6 semanas de vida) foram divididos em 3 grupos: grupo 1 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 5 µg, usando adjuvante de alumínio), grupo 2 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 1 µg, usando adjuvante de alumínio) e grupo 3 de Adjuvante de alumínio (em uma dose de imunização de 0,2 µg, usando adjuvante de alumínio). Cada grupo foi dividido mais em 8 subgrupos. Os Subgrupos de controle 1, 2 e 3 foram vacinados com VLP de HPV39N15 sozinha, VLP de HPV68N0 sozinha e VLP de HPV70N10 sozinha, respectivamente, o Subgrupo de controle 4 foi vacinado com a VLP de HPV39/HPV68/HPV70 (isto é, uma mistura de HPV39N15 VLP, HPV68N0 VLP e HPV70N10 VLP, em uma dada dose de imunização para cada VLP). Os Subgrupos de experimento 1, 2, 3 e 4 foram vacinados com VLP de H39N15-68T4-70S1, VLP de H39N15-68T4-

70S2, VLP de H39N15-68T4-70S3 e VLP de H39N15-68T4-70S5, respectivamente.

[0108] Em grupos de Adjuvante de alumínio 1-3, 5 camundongos/subgrupo foram vacinados através de injeção intraperitoneal, em uma dose de imunização de 5 µg, 1 µg e 0,2 µg, respectivamente, e um volume de injeção de 1 mL. Todos os camundongos foram submetidos à primeira vacinação na Semana 0, e então submetidos à vacinação de reforço nas Semanas 2 e 4, respectivamente. Na Semana 8, amostras de sangue foram coletadas por meio de sangramento orbital, e os títulos de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 em soro foram analisados. Os resultados de análise foram mostrados nas Figuras 8A-8C. Os resultados mostraram que VLP de H39N15-68T4-70S2, VLP de H39N15-68T4-70S3 e VLP de H39N15-68T4-70S5 foram capazes de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV39 em camundongos, e seus efeitos protetores foram significativamente mais fracos do que aqueles de VLP de HPV39N15 e aqueles da VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista na mesma dose, mas foram significativamente superiores àqueles de VLP de HPV68N0 sozinha e aqueles de VLP de HPV70N10 sozinha na mesma dose; e elas foram capazes de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV68 em camundongos, e seus efeitos protetores eram comparáveis àqueles de VLP de HPV68N0 sozinha e aqueles de VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista na mesma dose, e foram significativamente superiores àqueles de VLP de HPV39N15 sozinha e àqueles de VLP de HPV70N10 sozinha na mesma dose; e elas eram capazes de induzir a geração de anticorpos de neutralização de título alto contra HPV70 em camundongos, e seus efeitos protetores eram comparáveis àqueles de VLP de HPV70N10 sozinha e àqueles de VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista na mesma dose, e foram significativamente superiores àqueles de

VLP de HPV39N15 sozinha e àqueles de VLP de HPV68N0 sozinha na mesma dose. Isso mostrou que VLP H39N15-68T4-70S2, VLP H39N15-68T4-70S3 e VLP H39N15-68T4-70S5 tinha imunogenicidade cruzada e proteção cruzada boas contra HPV39, HPV68 e HPV70.

Tabela 9. Programa de Vacinação

Grupo	Antígeno para vacinação	Adjuvante	Dose de imunização	Número	Procedimento de vacinação (semana)
Grupo 1 de Adjuvante de alumínio	HPV39N15 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	HPV68N0 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	HPV70N10 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	A VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista	adjuvante de alumínio	5µg para cada VLP	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S1 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S2 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S3 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S5 VLP	adjuvante de alumínio	5µg	5	0, 2, 4
Grupo 2 de Adjuvante de alumínio	HPV39N15 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	HPV68N0 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	HPV70N10 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	A VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista	adjuvante de alumínio	1µg para cada VLP	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S1 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S2 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S3 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S5 VLP	adjuvante de alumínio	1µg	5	0, 2, 4
Grupo 3 de Adjuvante de alumínio	HPV39N15 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	HPV68N0 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	HPV70N10 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	A VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista	adjuvante de alumínio	0,2µg para cada VLP	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S1 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S2 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S3 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4
	H39N15-68T4-70S5 VLP	adjuvante de alumínio	0,2µg	5	0, 2, 4

Exemplo 6. Avaliação 2 de ED₅₀ de partículas do tipo vírus para indução de soroconversão

[0109] Nesse experimento, as partículas do tipo vírus usadas foram H39N15-68T4-70S2 VLP, H39N15-68T4-70S3 VLP e H39N15-68T4-70S5 VLP.

[0110] Camundongos fêmeas BalB/c de 6 semanas de vida (8 camundongos) foram vacinados com adjuvante de alumínio através de injeção intraperitoneal única, em que VLP de H39N15-68T4-70S2, VLP de H39N15-68T4-70S3 e VLP de H39N15-68T4-70S5 (em uma dose de imunização de 0,900µg, 0,300µg, 0,100µg, 0,033µg ou 0,011µg) foram usadas nos Grupos experimentais e VLP de HPV39N15 sozinha, VLP de HPV68N0 sozinha, VLP de HPV70N10 sozinha (em uma dose de imunização de 0,900µg, 0,300µg, 0,100µg, 0,033µg ou 0,011µg) ou a VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista (i.e. uma mistura de VLP de HPV39N15, VLP de HPV68N0 e VLP de HPV70N10, em uma dose de imunização de 0,900µg, 0,300µg, 0,100µg, 0,033µg ou 0,011µg para cada VLP); o volume de imunização era 1 mL. Em adição, o diluente usado para diluir a vacina foi usado como um controle em branco. 8 camundongos foram vacinados em cada grupo, e na Semana 5 após a vacinação, sangue venoso foi coletado do globo ocular. Anticorpos contra HPV no soro foram detectados, e através do método Reed-Muench (Reed, L.J. MH. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938; 27:493-7), ED50 para indução de soroconversão (isto é, indução da geração de anticorpos em camundongos) foi calculada para cada amostra. Os resultados foram mostrados nas Tabelas 10-16.

Tabela 10. ED50 de VLP de HPV39N15 para indução da geração de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	8	100,00%	0,019
	0,300	8	8	100,00%	
	0,100	8	8	100,00%	
	0,033	8	7	88,89%	
	0,011	8	1	11,11%	
HPV68	0,900	8	0	11,11%	>0,9
	0,300	8	0	5,88%	
	0,100	8	0	4,00%	
	0,033	8	1	3,13%	
	0,011	8	0	0,00%	
HPV70	0,900	8	0	11,11%	>0,9
	0,300	8	1	6,25%	
	0,100	8	0	0,00%	
	0,033	8	0	0,00%	
	0,011	8	0	0,00%	

Tabela 11. ED50 para VLP de HPV68N0 para indução da geração de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	0	20,00%	>0,9
	0,300	8	0	11,11%	
	0,100	8	1	8,00%	
	0,033	8	1	3,23%	
	0,011	8	0	0,00%	
HPV68	0,900	8	8	100,00%	0,021
	0,300	8	8	100,00%	
	0,100	8	8	100,00%	
	0,033	8	6	77,78%	
	0,011	8	1	10,00%	
HPV70	0,900	8	2	50,00%	0,9
	0,300	8	2	25,00%	
	0,100	8	0	9,09%	
	0,033	8	2	7,14%	
	0,011	8	0	0,00%	

Tabela 12. ED₅₀ de VLP de HP70N10 para indução da geração de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	2	40,00%	>0,9
	0,300	8	0	12,50%	
	0,100	8	1	8,70%	
	0,033	8	1	3,45%	
	0,011	8	0	0,00%	
HPV68	0,900	8	0	0,00%	>0,9
	0,300	8	0	0,00%	
	0,100	8	0	0,00%	
	0,033	8	0	0,00%	
	0,011	8	0	0,00%	
HPV70	0,900	8	8	100,00%	0,017
	0,300	8	8	100,00%	
	0,100	8	8	100,00%	
	0,033	8	7	90,00%	
	0,011	8	2	22,22%	

Tabela 13. ED₅₀ da VLP de HPV39/HPV68/HPV70 mista para indução da geração de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900 µg para cada VLP	8	8	100,00%	0,021
	0,300µg para cada VLP	8	8	100,00%	
	0,100µg para cada VLP	8	7	93,75%	
	0,033µg para cada VLP	8	7	80,00%	
	0,011µg para cada VLP	8	1	10,00%	
HPV68	0,900µg para cada VLP	8	8	100,00%	0,019
	0,300µg para cada VLP	8	8	100,00%	
	0,100µg para cada VLP	8	7	94,12%	
	0,033µg para cada VLP	8	7	81,82%	
	0,011µg para cada VLP	8	2	20,00%	
HPV70	0,900µg para cada VLP	8	8	100,00%	0,021
	0,300µg para cada VLP	8	8	100,00%	
	0,100µg para cada VLP	8	7	93,75%	
	0,033µg para cada VLP	8	7	80,00%	
	0,011µg para cada VLP	8	1	10,00%	

Tabela 14. ED₅₀ de VLP de H39N15-68T4-70S2 para indução da geração de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	8	100,00%	0,017
	0,300	8	7	96,15%	
	0,100	8	8	94,74%	
	0,033	8	8	90,91%	
	0,011	8	2	22,22%	
HPV68	0,900	8	6	100,00%	0,028
	0,300	8	8	91,67%	
	0,100	8	7	82,35%	
	0,033	8	6	58,33%	
	0,011	8	1	7,69%	
HPV70	0,900	8	7	96,30%	0,033
	0,300	8	7	90,48%	
	0,100	8	5	70,59%	
	0,033	8	6	50,00%	
	0,011	8	1	6,67%	

Tabela 15. ED₅₀ de VLP de H39N15-68T4-70S3 para indução da geração de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	3	50,00%	0,9
	0,300	8	1	14,29%	
	0,100	8	0	4,76%	
	0,033	8	1	3,57%	
	0,011	8	0	0,00%	
HPV68	0,900	8	7	96,88%	0,020
	0,300	8	7	92,31%	
	0,100	8	7	85,00%	
	0,033	8	8	76,92%	
	0,011	8	2	18,18%	
HPV70	0,900	8	4	63,64%	0,611
	0,300	8	3	25,00%	
	0,100	8	0	0,00%	
	0,033	8	0	0,00%	
	0,011	8	0	0,00%	

Tabela 16. ED50 de VLP de H39N15-68T4-70S5 para indução da geração de anticorpos contra HPV39, HPV68 e HPV70 (soroconversão) em camundongos

Tipo	Dose de imunização (µg)	Número total de camundongos	Número de camundongos com conversão positiva	Taxa de conversão positiva	ED ₅₀ (µg)
HPV39	0,900	8	7	96,97%	0,019
	0,300	8	7	92,59%	
	0,100	8	8	90,00%	
	0,033	8	8	83,33%	
	0,011	8	2	20,00%	
HPV68	0,900	8	8	100,00%	0,148
	0,300	8	8	100,00%	
	0,100	8	1	22,22%	
	0,033	8	1	6,67%	
	0,011	8	0	0,00%	
HPV70	0,900	8	7	96,30%	0,042
	0,300	8	6	86,36%	
	0,100	8	8	81,25%	
	0,033	8	4	41,67%	
	0,011	8	1	6,67%	

[0111] Os resultados mostraram que 5 semanas após a vacinação dos camundongos, a ED50 de VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5 para indução da geração de anticorpos contra HPV39 em camundongos era comparável àquela de VLP de HPV39N15 sozinha e àquela da VLP de HPV39/HPV68/HPV70, e era significativamente superior àquela de VLP de HPV68N0 sozinha e aquela de VLP de HPV70N10; e sua ED50 para indução da geração de anticorpos contra HPV68 em camundongos era comparável àquela de VLP de HPV68N0 e àquela de VLP de HPV39/HPV68/HVP70, e era significativamente superior àquela de VLP HPV39N15 sozinha e àquela de VLP de HPV70N10 sozinha; e sua ED50 para indução da geração de anticorpos contra HPV70 em camundongos era comparável àquela de VLP de HPV70N10 e àquela da mistura de VLP de HPV39/HPV68/HPV70, e era significativamente superior àquela de VLP de HPV39N15 sozinha e àquela de VLP de HPV68N0 sozinha. Isso mostrou que VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5 tinha imunogenicidade cruzada e proteção cruzada contra HPV39, HPV68 e HPV70.

Exemplo 7: avaliação de termoestabilidade de partículas do tipo vírus

[0112] As VLPs formadas pela proteína HPV38N15, proteína HPV68N0, proteína HPV70N10, proteína H39N15-68T4, proteína H39N15-68T4-70S2 e proteína H39N15-68T4-70S5 foram avaliadas quanto à sua termoestabilidade usando um calorímetro de varredura diferencial VP Cappillary DSC comprado da GE Company (isto é, a original MicroCal Co.), em que o tampão de armazenamento para a proteína foi usado como controle, e foi feita varredura das proteínas em uma taxa de aquecimento de 1,5°C/min dentro de uma faixa de temperatura de 10°C-90°C. Os resultados da detecção foram mostrados na Figura 9. Os resultados mostraram que todas essas VLPs formadas

pela proteína H39N15-68T4, proteína H39N15-68T4-70S2 e proteína H39N15-68T4-70S5 tinham termoestabilidade muito alta.

Exemplo 8: reconstrução das estruturas tridimensionais de VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5

[0113] As estruturas tridimensionais de VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5 foram reconstruídas através do experimento de reconstrução de estrutura tridimensional usando microscopia crioelétrica (cryo-EM) (Wolf, M., Garcea, R.L., Grigorieff, N. e outros. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2010), 107(14): 6298-303). Em suma, na fotografia de microscopia crio-elétrica (crio-EM) de VLP de H39N15-68T4-70S2 (A da Figura 10), 6410 partículas com um tamanho uniforme e um diâmetro de mais de 50 nm foram selecionadas para sobreposição por computador e reconstrução estrutural, dessa maneira obtendo a estrutura tridimensional de VLP de H39N15-68T4-70S2. A estrutura tridimensional obtida foi mostrada em B da Figura 10 (em uma resolução de 14,51Å). Ainda, na fotografia da microscopia crio-elétrica (cryo-EM) de VLP de H39N15-68T4-70S5 (C da Figura 10), 617 partículas com um tamanho uniforme e um diâmetro maior do que 50 nm foram selecionadas para sobreposição por computador e reconstrução estrutural, dessa maneira obtendo a estrutura tridimensional de VLP de H39N15-68T4-70S5. A estrutura tridimensional obtida foi mostrada em D da Figura 10 (em uma resolução de 17,64Å). Os resultados mostraram que ambas VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5 tinham uma estrutura icosaedral T=7 (h=1, k=2) consistindo em 72 capsômeros (subunidade morfológica, pentâmero). Diferente dos capsídeos virais icosaedrais convencionais consistentes com princípio de quase-equivalência, todas as subunidades constitutivas nas estruturas de VLP de H39N15-68T4-70S2 e VLP de H39N15-68T4-70S5 eram pentâmeros, sem hexâmero. Além disso, as ditas VLPs tinham um diâmetro externo de cerca de

60 nm. Essas eram similares às estruturas tridimensionais das partículas de HPV virais naturais anteriormente reportadas e da VLP de HPV preparada através do sistema de expressão eucariótico (por exemplo, sistema de expressão de poxvírus) (Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H. e outros, *Biophys J.* (1991), 60(6): 1445-1456. Hagensee, M.E., Olson, N.H., Baker, T.S. e outros, *J. Virol.* (1994), 68(7):4503-4505. Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D. e outros, *J. Virol.* (2008), 82(11): 5190-7).

[0114] Embora as modalidades específicas da presente invenção tenham sido descritas em detalhes, aqueles versados na técnica compreenderiam que, de acordo com os ensinamentos revelados no relatório, várias modificações e mudanças podem ser feitas nas mesmas, e que tais modificações e mudanças estão dentro do escopo da presente invenção. O escopo da presente invenção é dado pelas reivindicações apensas e quaisquer equivalentes das mesmas.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, caracterizada pelo fato de que comparada com uma proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem,

(I) a proteína L1 de HPV39 mutada tem as mutações que seguem:

(1) truncamento N-terminal de 1 a 25 aminoácidos; e
(2) substituição de resíduos de aminoácidos nas posições 269 a 288 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um segundo tipo de HPV do tipo selvagem;

ou

(II) a proteína L1 de HPV39 mutada tem as mutações como definido em (1) e (2), e tem ainda a mutação que segue:

(3) (a) substituição de resíduos de aminoácido nas posições 117 a 140 da proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem; ou

(b) substituição de resíduos de aminoácido nas posições 169 a 181 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem; ou

(c) substituição de resíduos de aminoácido nas posições 347 a 358 de proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem com resíduos de aminoácido nas posições correspondentes de uma proteína L1 de um terceiro tipo de HPV do tipo selvagem,

e, a variante difere da proteína L1 de HPV39 mutada apenas pela substituição, adição ou deleção de, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9- aminoácidos, e retém a função da proteína L1 de HPV39 mutada,

isto é, capacidade de induzir geração de anticorpos de neutralização contra pelo menos dois tipos de HPV.

2. Proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína L1 de HPV39 mutada tem 3, 5, 8, 12, 15, 18, 20 ou 22 aminoácidos truncados no terminal N, comparado com a proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem.

3. Proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o segundo tipo de HPV do tipo selvagem é HPV68;

preferivelmente, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (2) são resíduos de aminoácido nas posições 270 a 289 de uma proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem.

4. Proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o terceiro tipo de HPV do tipo selvagem é HPV70;

preferivelmente, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (3) (a) são resíduos de aminoácido nas posições 117 a 141 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem;

preferivelmente, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (3) (b) são resíduos de aminoácido nas posições 170 a 182 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem;

preferivelmente, os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes como descrito em (3) (c) são resíduos de aminoácido nas posições 348 a 359 de uma proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem.

5. Proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a proteína L1 de HPV39 mutada tem um ou mais dos itens que seguem:

(i) a proteína L1 de HPV39 do tipo selvagem tem uma sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 1;

(ii) a proteína L1 de HPV68 do tipo selvagem tem uma sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 2;

(iii) a proteína L1 de HPV70 do tipo selvagem tem uma sequência de aminoácido como mostrado na SEQ ID N°: 3.

6. Proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a proteína L1 de HPV39 mutada tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID N°: 7, 10, 11 e 12.

7. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que codifica a proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, preferivelmente, o ácido nucleico isolado tem uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 19, 22, 23 e 24.

8. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 7.

9. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 7 e/ou o vetor, como definido na reivindicação 8.

10. Partícula do tipo vírus HPV, caracterizada pelo fato de que compreende ou consiste na proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

11. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou o ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 7, ou o vetor, como

definido na reivindicação 3, ou a célula hospedeira, como definida na reivindicação 9, ou a partícula do tipo vírus HPV, como definida na reivindicação 10.

12. Composição farmacêutica ou vacina, caracterizada pelo fato de que compreende a partícula do tipo vírus HPV, como definida na reivindicação 10, e, opcionalmente, um veículo e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável,

preferivelmente, a partícula tipo vírus HPV está presente em uma quantidade eficaz para prevenção de infecção por HPV ou uma doença causada por infecção por HPV;

preferivelmente, a infecção por HPV é infecção por um ou mais tipos de HPV;

preferivelmente, a infecção por HPV é selecionada de: infecção por HPV39, infecção por HPV68, infecção por HPV70 e qualquer combinação das mesmas;

preferivelmente, a doença causada por infecção por HPV é selecionada do grupo consistindo em câncer cervical e verruga genital.

13. Método para preparação da proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma, como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende expressar a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma em uma célula hospedeira, e então recuperar a proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma a partir de uma cultura da célula hospedeira;

preferivelmente, a célula hospedeira é *E. coli*;

preferivelmente, o método compreende as etapas de: expressão da proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma em *E. coli*, e então obtenção da proteína L1 de HPV39 mutada ou uma variante da mesma através da purificação de um sobrenadante de lisato da *E. coli*;

preferivelmente, recuperação da proteína L1 de HPV39

mutada ou uma variante da mesma a partir do sobrenadante de lisato da *E. coli* através de cromatografia;

preferivelmente, a cromatografia é selecionada de: cromatografia de troca catiônica, cromatografia de hidroxapatita, cromatografia de interação hidrofóbica e qualquer combinação das mesmas.

14. Método para preparação de uma vacina, caracterizado pelo fato de que compreende combinar a partícula do tipo vírus HPV, como definida na reivindicação 10, com um veículo e/ou excipiente farmacologicamente aceitável.

15. Uso da proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, com definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou da partícula do tipo vírus HPV, como definida na reivindicação 10, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição farmacêutica ou vacina para prevenção de infecção por HPV ou uma doença causada por infecção por HPV,

preferivelmente, a infecção por HPV é infecção por um ou mais tipos de HPV;

preferivelmente, a infecção por HPV é selecionada de:

infecção por HPV39, infecção por HPV68, infecção por HPV70 e qualquer combinações das mesmas;

preferivelmente, a doença causada por infecção por HPV é selecionada do grupo consistindo em câncer cervical e verruga genital.

16. Proteína L1 de HPV39 mutada, ou uma variante da mesma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou a partícula do tipo vírus HPV, como definida na reivindicação 10, caracterizada pelo fato de ser para uso na prevenção de infecção por HPV ou uma doença causada por infecção por HPV,

preferivelmente, a infecção por HPV é infecção por um ou mais tipos de HPV;

preferivelmente, a infecção por HPV é selecionada de:
infecção por HPV39, infecção por HPV68, infecção por HPV70 e qualquer combinação das mesmas;

preferivelmente, a doença causada por infecção por HPV é selecionada do grupo consistindo em câncer cervical e verruga genital.

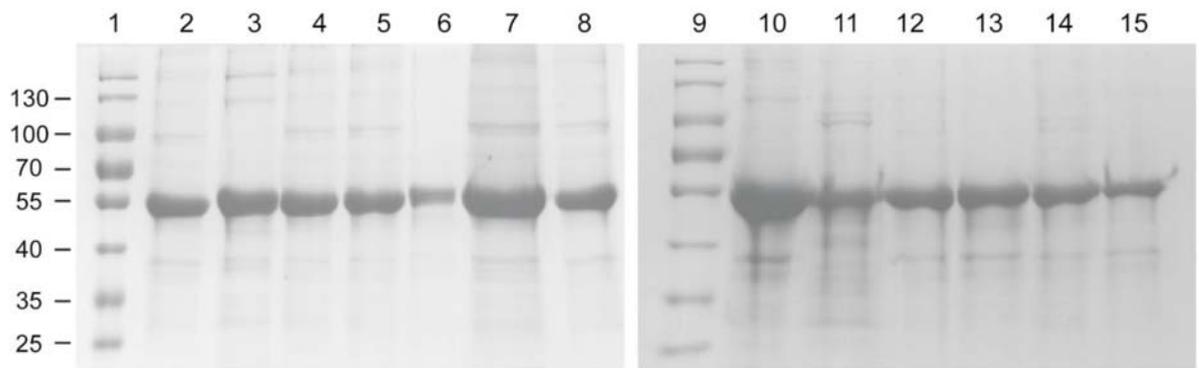


FIG. 1

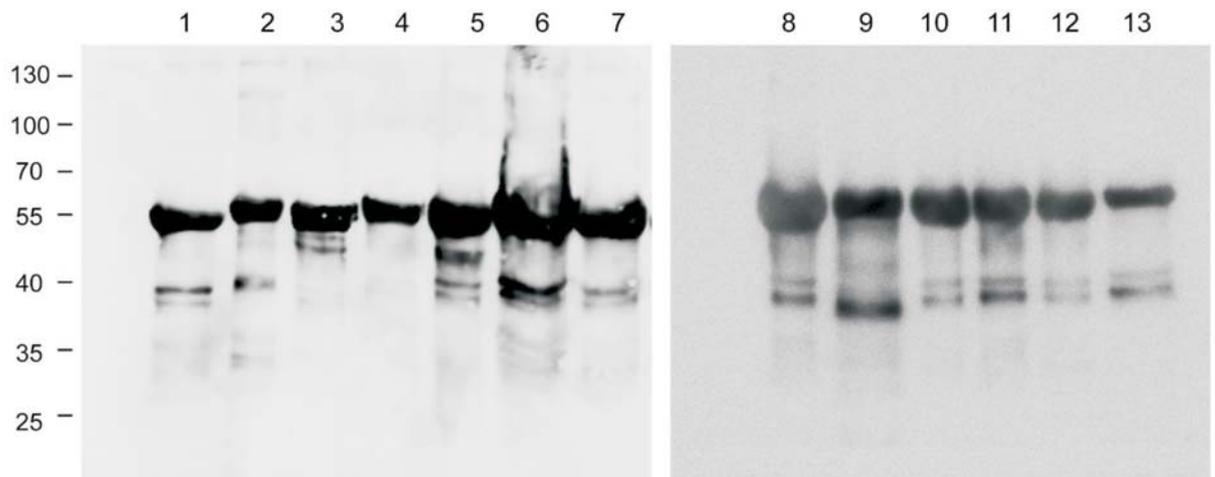


FIG. 2

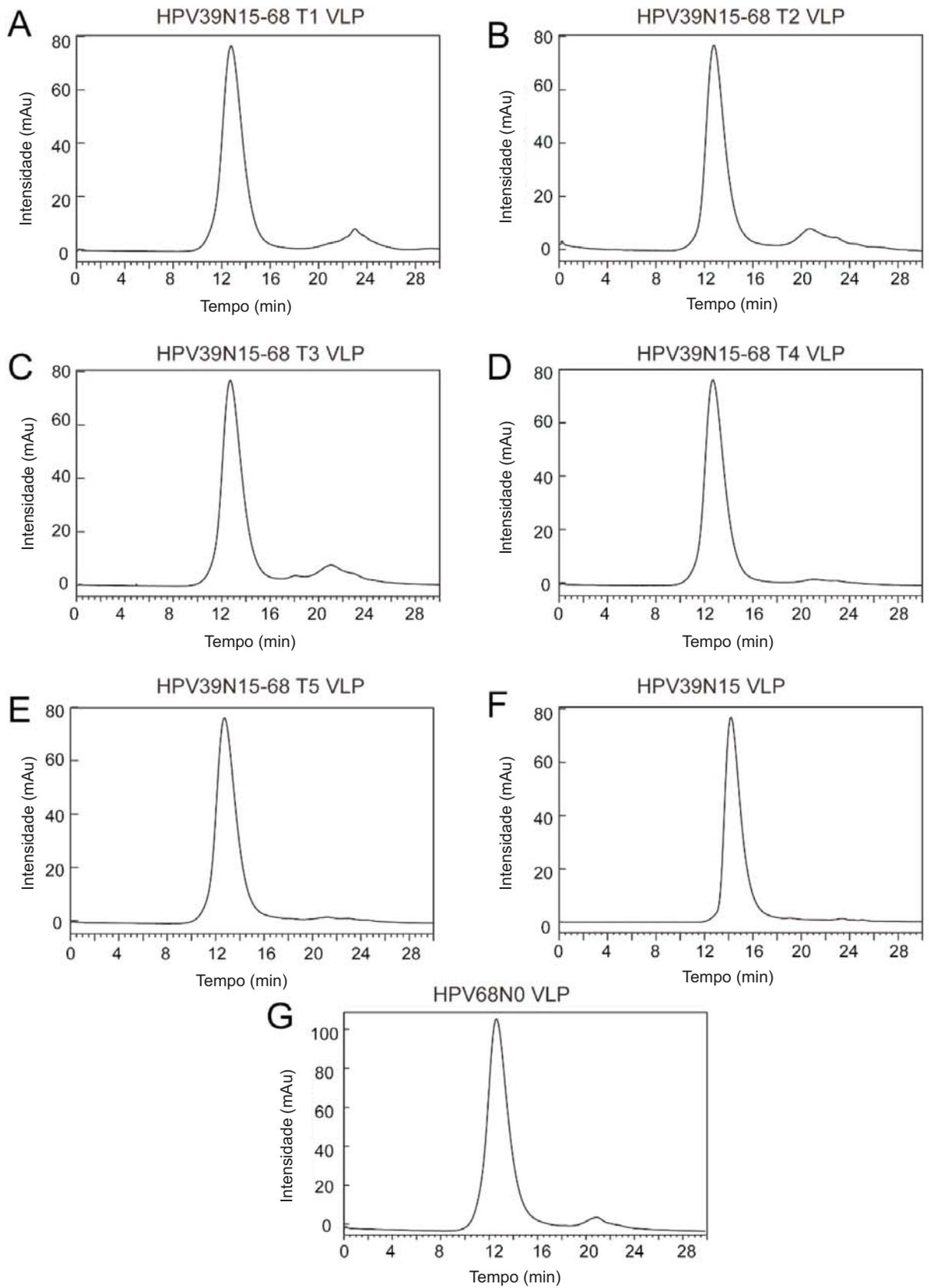


FIG. 3

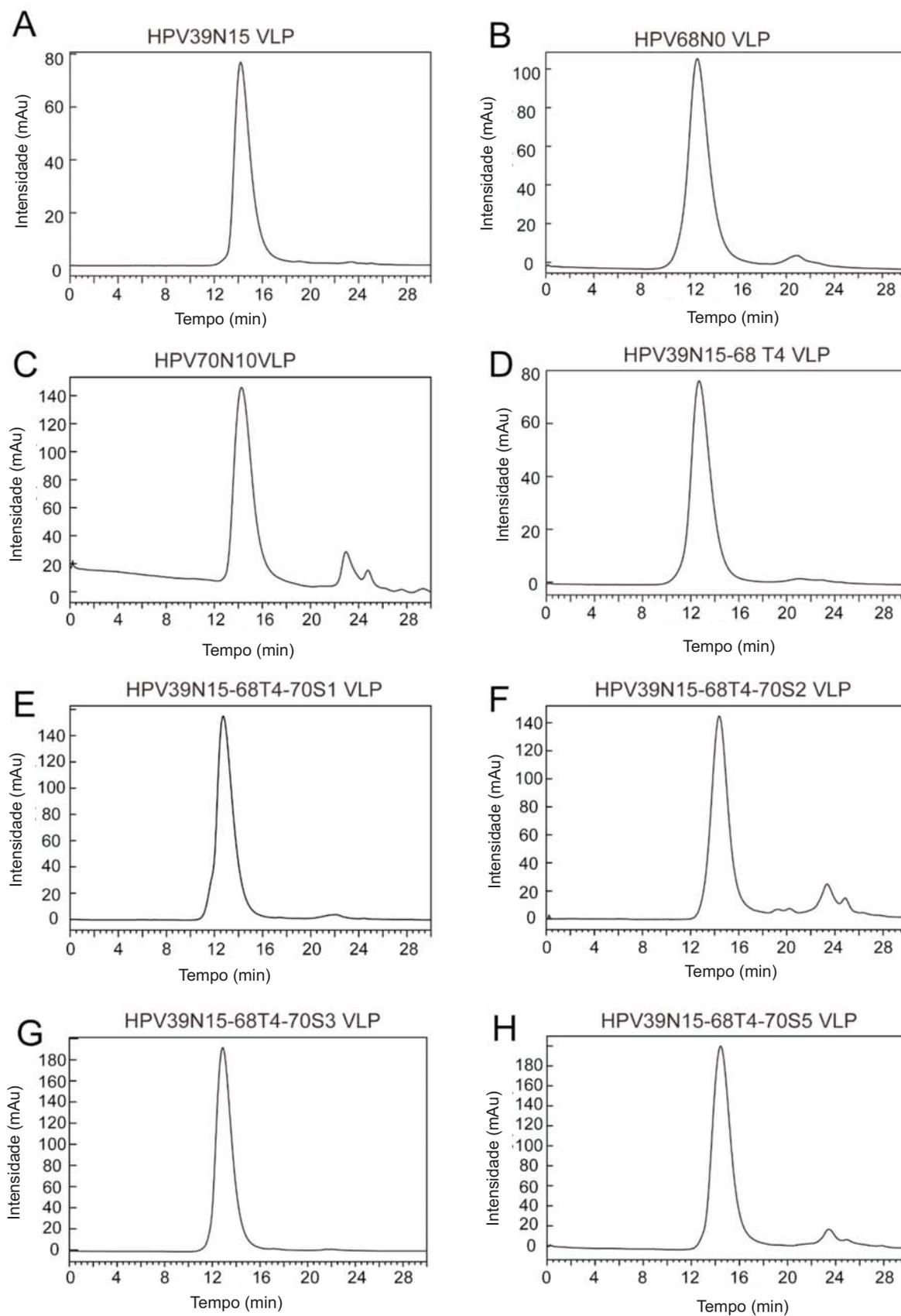


FIG. 4

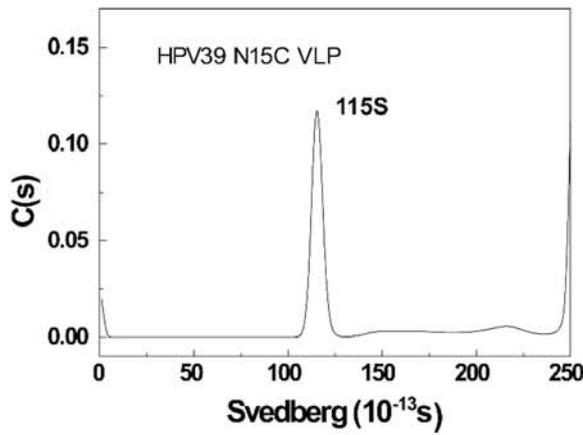


FIG. 5A

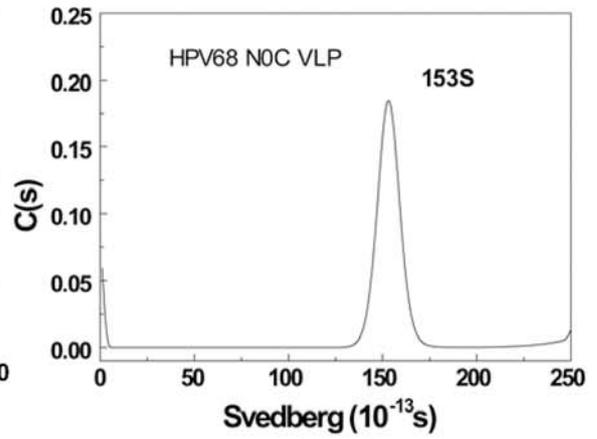


FIG. 5B

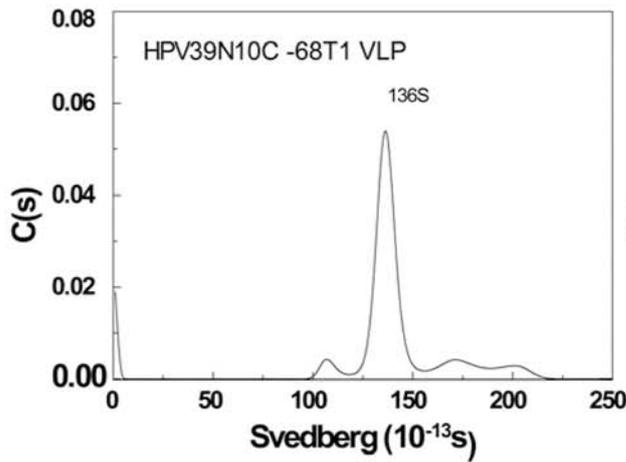


FIG. 5C

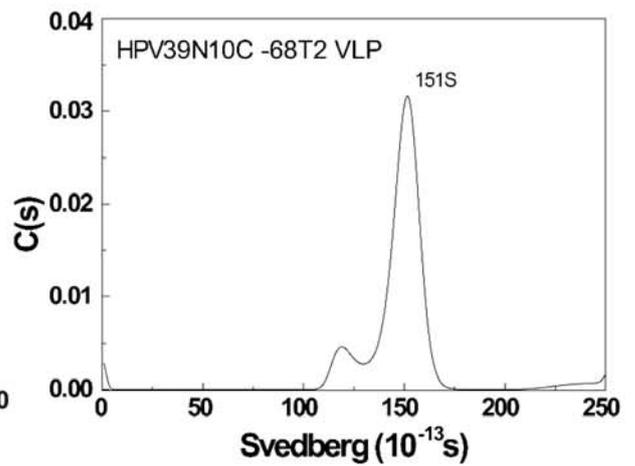


FIG. 5D

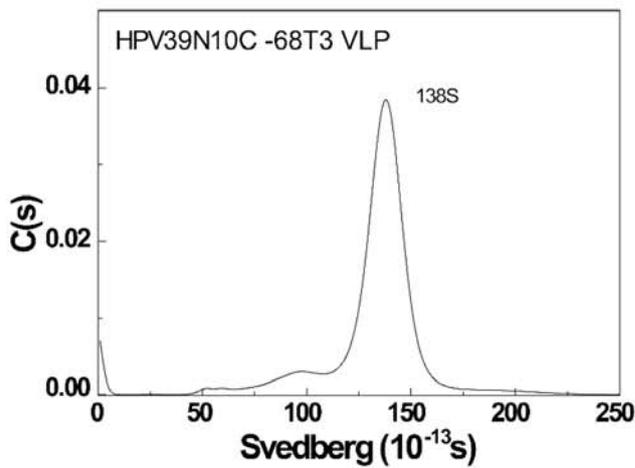


FIG. 5E

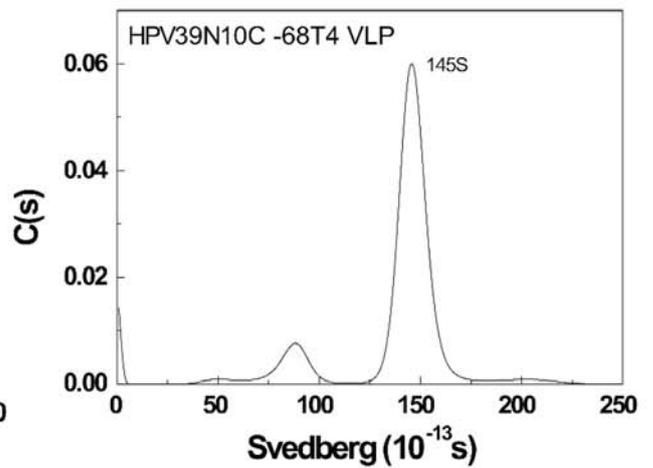


FIG. 5F

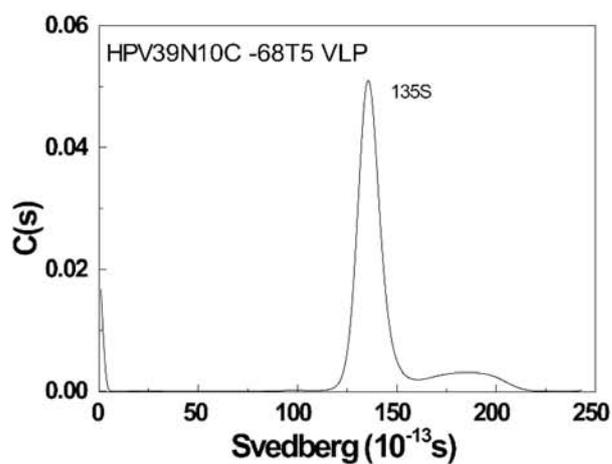


FIG. 5G

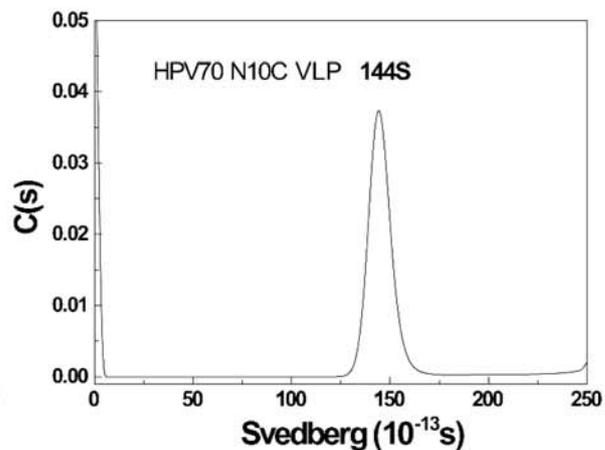


FIG. 5H

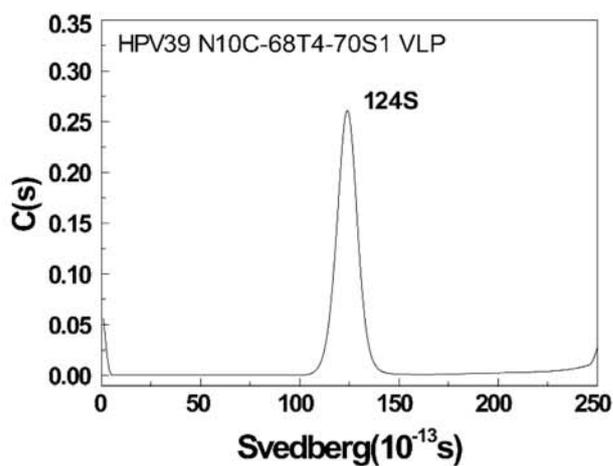


FIG. 5I

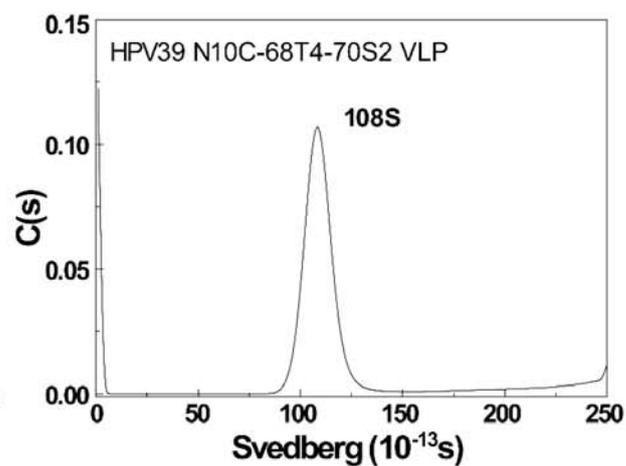


FIG. 5J

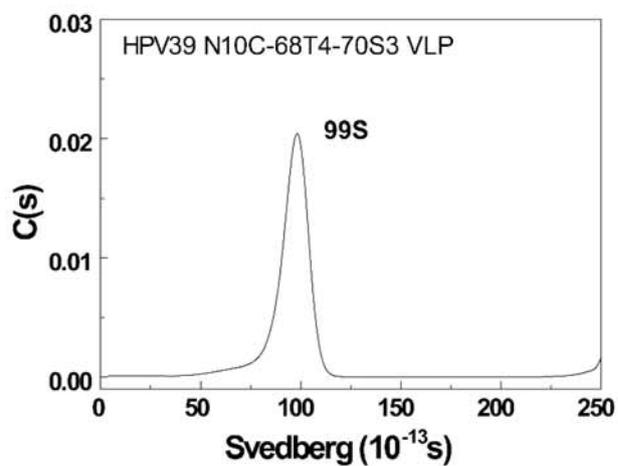


FIG. 5K

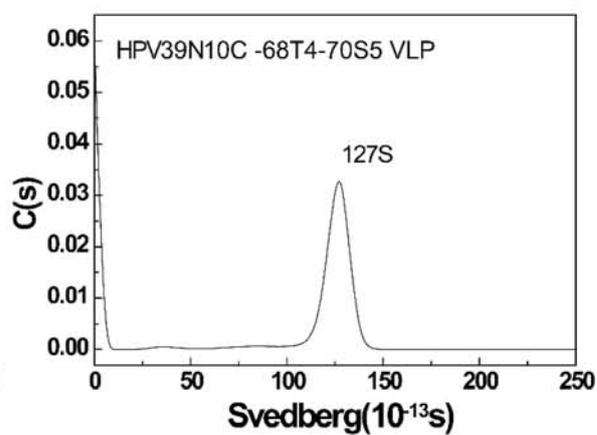


FIG. 5L

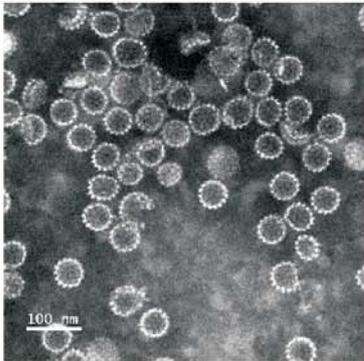


FIG. 6A

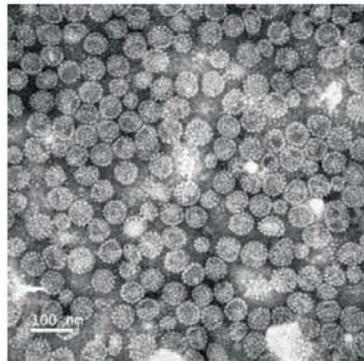


FIG. 6B

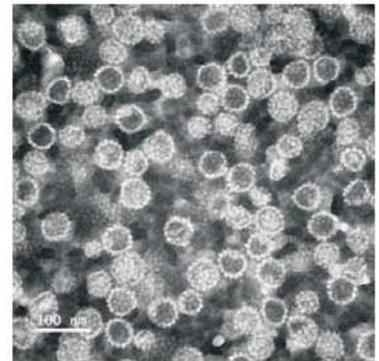


FIG. 6C

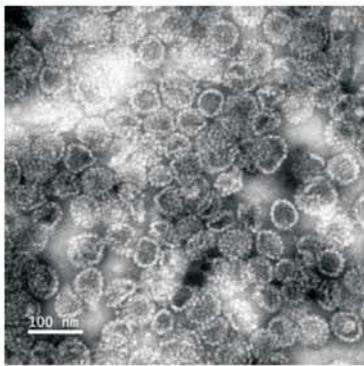


FIG. 6D

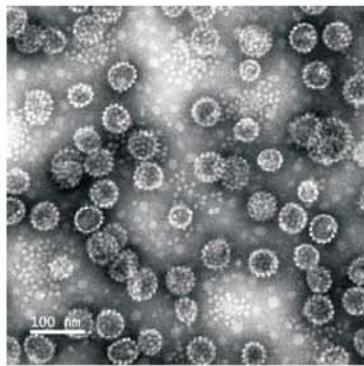


FIG. 6E

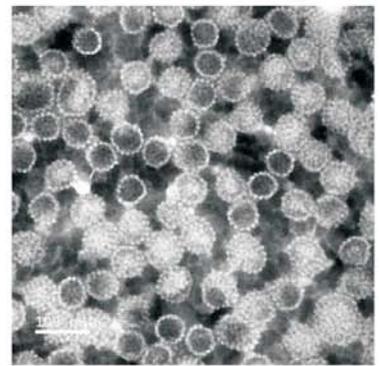


FIG. 6F

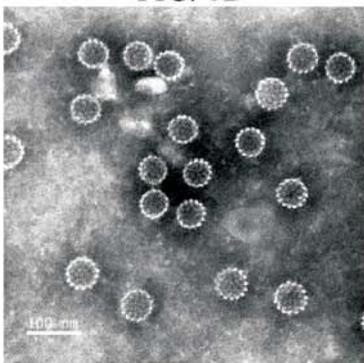


FIG. 6G

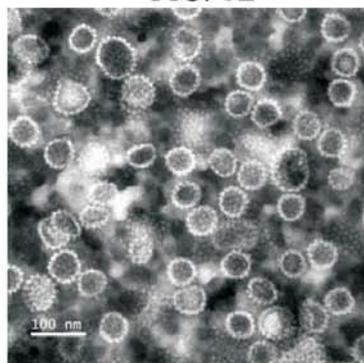


FIG. 6H

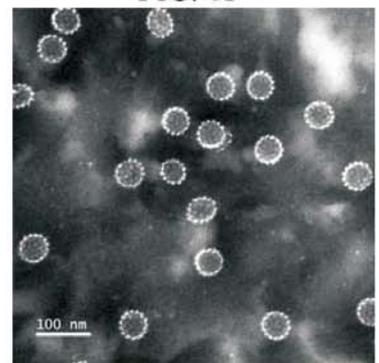


FIG. 6I

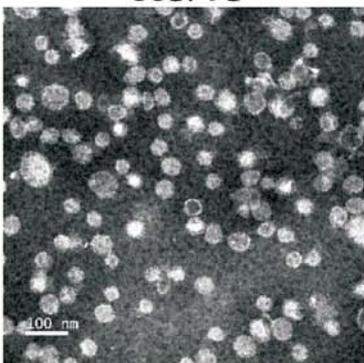


FIG. 6J

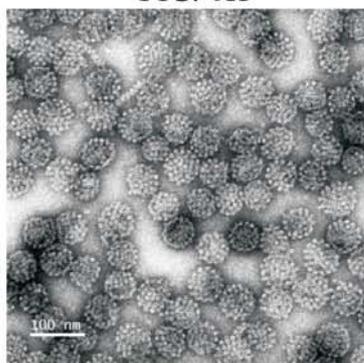


FIG. 6K

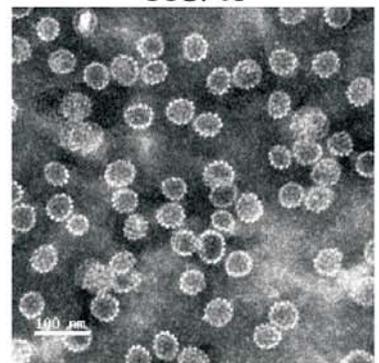


FIG. 6L

7/10

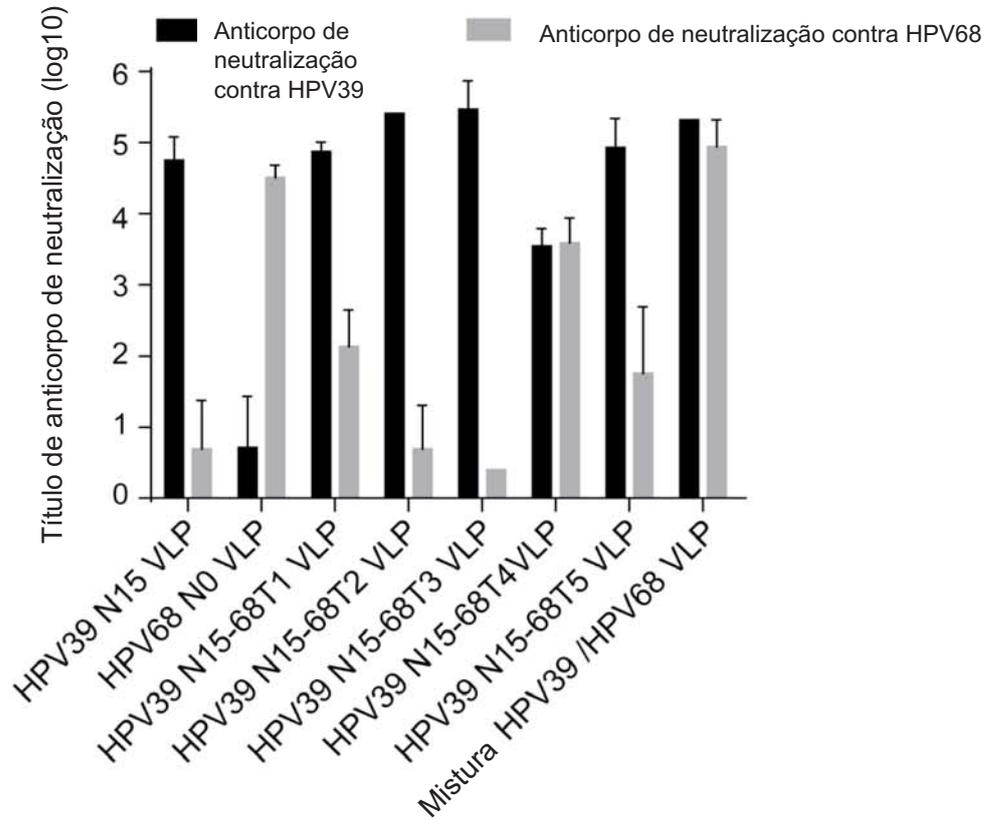


FIG. 7A

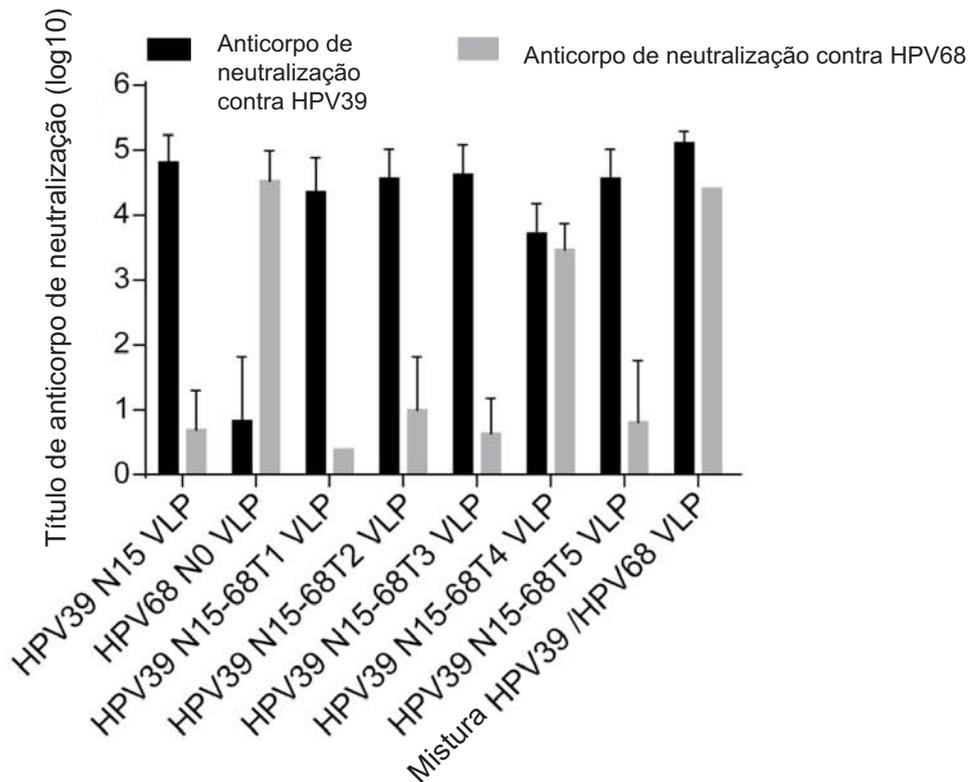


FIG. 7B

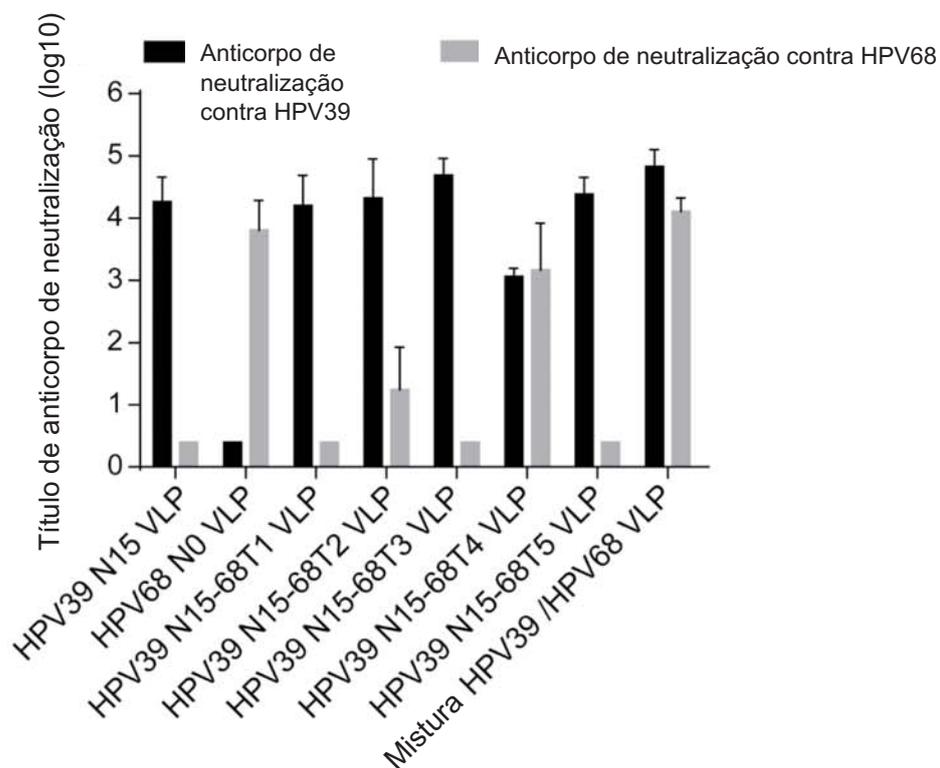


FIG. 7C

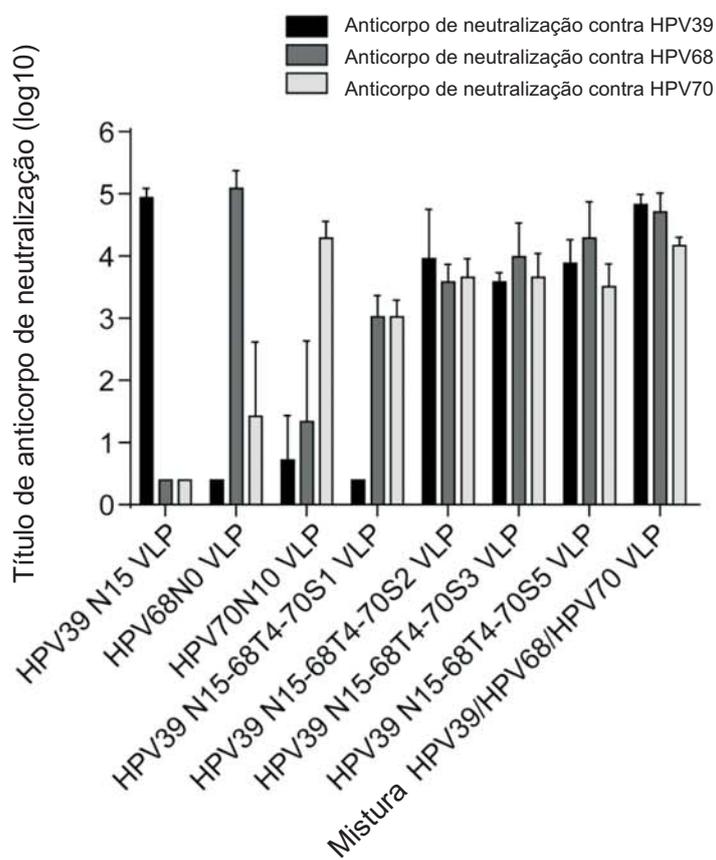


FIG. 8A

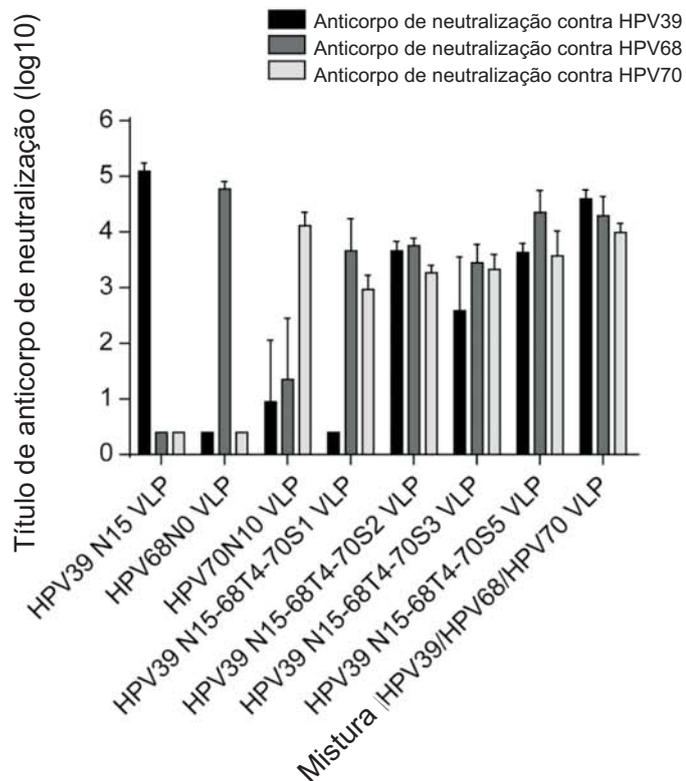


FIG. 8B

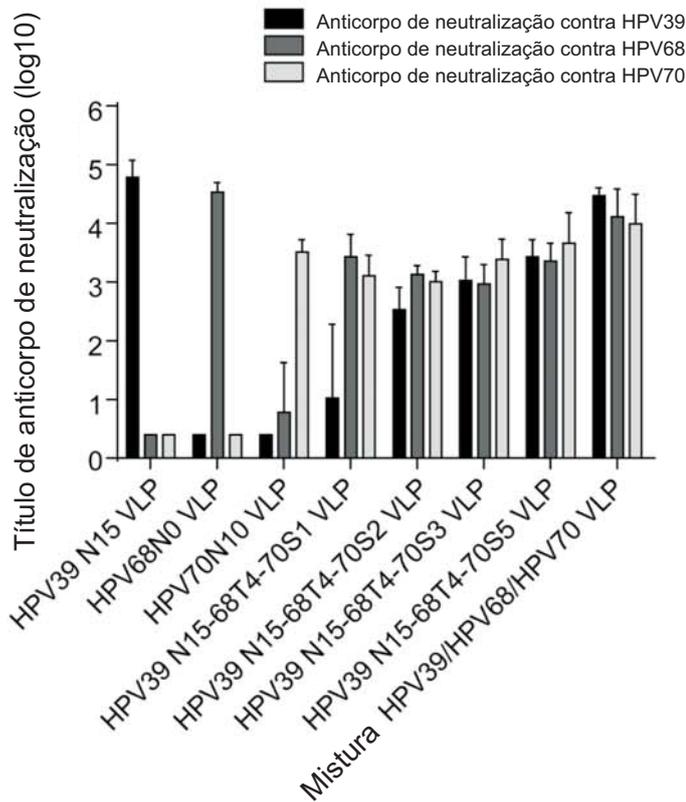


FIG. 8C

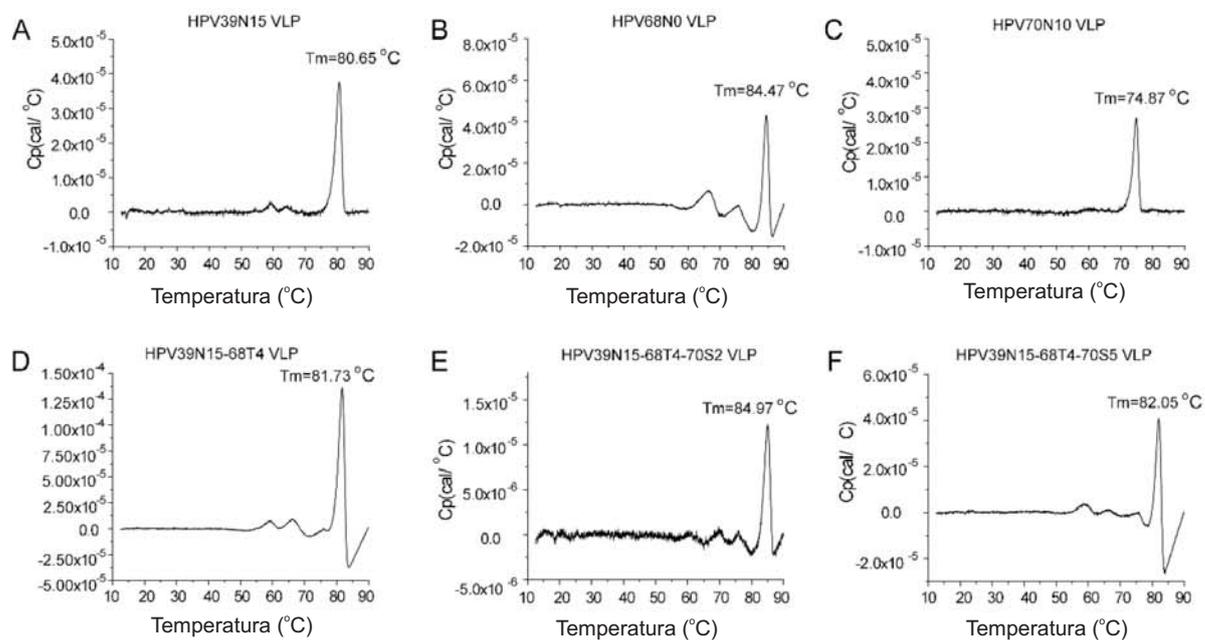


FIG. 9

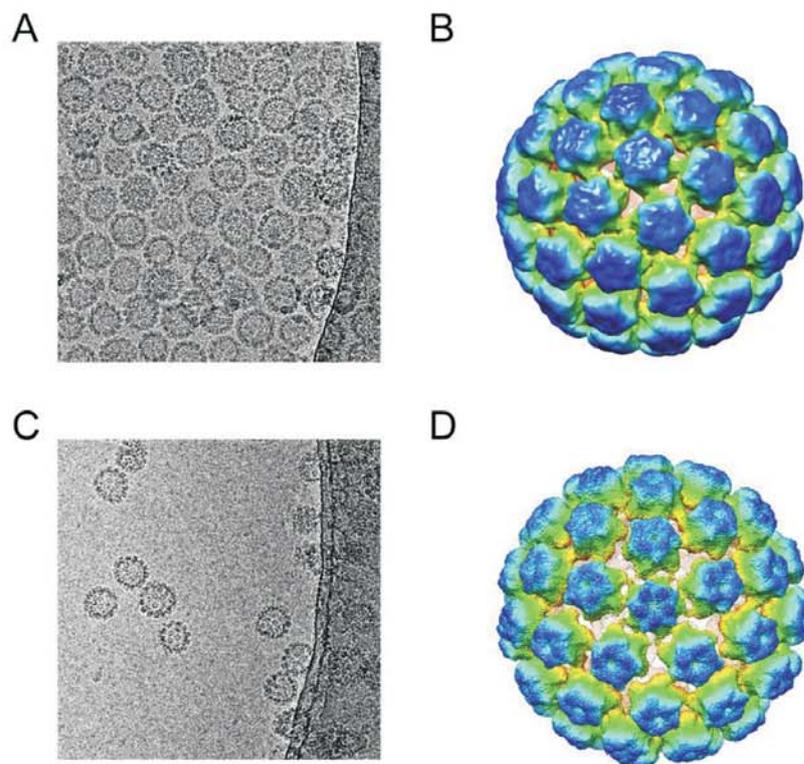


FIG. 10

RESUMO

Patente de Invenção: **"MUTANTE DE PROTEÍNA L1 DO TIPO 39 DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO"**.

A presente invenção refere-se a uma proteína L1 de HPV39 mutada (ou uma variante da mesma), à sequência de codificação da mesma e a um método de preparação para a mesma, bem como uma partícula do tipo vírus compreendendo a mesma. A proteína (ou uma variante da mesma) e a partícula do tipo vírus são capazes de induzir um anticorpo de neutralização combatendo pelo menos dois tipos de HPVs (tais como HPV39 e HPV68 ou HPV39, HPV68 e HPV70), e então pode ser usada para prevenção de infecções dos pelo menos dois tipos de HPVs e doenças causadas pelas infecções, tais como câncer cervical e verruga genital. Estão também envolvidos os usos da proteína e da partícula do tipo vírus na preparação de uma composição farmacêutica ou uma vacina. A composição farmacêutica ou vacina pode ser usada para prevenção de infecções dos pelo menos dois tipos de HPVs e doenças causadas pelas infecções, tais como câncer cervical e verruga genital.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA JUNTADA DE TRADUÇÃO 30
- Data de Geração do Código: 29/12/2020
- Hora de Geração do Código: 16:14:52
- Código de Controle:
 - Campo 1: 1521126305F0275A
 - Campo 2: D6A71711F40C364A