



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 263 405**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/37 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05075369 .8**

(96) Fecha de presentación : **08.03.1994**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1618888**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

(54) Título: **Producción de proteína de cápside del papilomavirus humano y partículas de tipo virus.**

(30) Prioridad: **09.03.1993 US 28517**
07.03.1994 US 207309

(73) Titular/es: **The University of Rochester**
518 Hylan Building
Rochester, New York 14627-0140, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

(72) Inventor/es: **Rose, Robert C.;**
Bonnez, William y
Reichman, Richard C.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

(74) Agente: **Urízar Anasagasti, José Antonio**

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

DESCRIPCIÓN

Producción de proteína de cápside del papilomavirus humano y partículas de tipo virus.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere de forma general al papilomavirus (PV). La descripción describe un método de expresar la secuencia codificante de proteína de cápside de papilomavirus humano de tipo 6 (HPV-6) y de tipo 11 (HPV-11) usando el sistema de expresión en baculovirus, producción de partículas de tipo virus (VLP) de HPV y el uso de estas VLP en la producción de anticuerpos que reconocen epítopos en HPV y para el desarrollo de la vacuna de HPV y para el desarrollo de ensayos serológicos para la detección de la infección por HPV, pero los mismos no forman parte de la invención como tal.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La familia Papovaviridae constituye un grupo de virus de ADN que inducen tanto infecciones líticas como tumores benignos o malignos. Estructuralmente, todos son viriones icosaédricos desnudos con 72 capsómeros y contienen ADN circular bicatenario. Los virus incluidos en la familia son: (1) papilomavirus humanos y animales, (2) poliomavirus de ratón, (3) virus vacuolantes de simio y (4) virus BK y JC humanos.

Los papilomavirus humanos (HPV) infectan epitelios cutáneo, genital, oral y respiratorio de un modo específico de tejido. La infección por HPV se ha asociado estrechamente con el desarrollo tanto de lesiones benignas como de neoplasias malignas (Reichman et al., *Papillomaviruses*, 1990, págs. 1191-1200; y Mandell et al., *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3^a Edición, Churchill Livingstone, New York, N.Y.). Por ejemplo, el HPV de tipo 1 (HPV-1) está presente en verrugas plantares, los HPV de tipos 6 u 11 (HPV-6 o HPV-11) en condylomata acuminata (verrugas anogenitales), mientras que el HPV de tipos 16 ó 18 (HPV-16 ó HPV-18) son comunes en lesiones premalignas y malignas del epitelio escamoso cervical (véase Crum et al., "Human papillomavirus infection and cervical neoplasia: New perspectives," 1984, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, vol. 3, págs. 376-388; zur Hausen, *Genital Papillomavirus Infections*, 1985, págs. 83-90; Rigby et al., *Viruses and Cancer*, Cambridge University Press, Cambridge, UK; y Koutsky et al., "Epidemiology of genital human papillomavirus infection," 1988, *Epidemiol. Rev.*, vol. 10, págs. 122-163).

Sin embargo, las dificultades en la propagación del HPV *in vitro* ha conducido al desarrollo de estrategias alternativas para la producción de antígenos para estudios inmunológicos. Por ejemplo, Bonnez et al., "The PstI-XbaI restriction fragment of the HPV-6b L1 ORF lacks immunological specificity as determined by sera from HPV 6 condyloma acuminatum patients and controls," 1990, *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.*, New Series, vol. 124, págs. 77-80; Jenison et al., "Identification of immunoreactive antigens of human papillomavirus type 6b by using Escherichia coli-expressed fusion proteins," 1988, *J. Virol.*, vol. 62, págs. 2115-2123; Li et al., "Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera," 1987, *J. Virol.*, vol. 61, págs. 2684-2690; Steele et al., "Humoral assays of human sera to disrupted and nondisrupted epitopes of human papillomavirus type 1," 1990, *Virology*, vol. 174, págs. 388-398; and Strike et al., "Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the 'common antigen,'" 1989, *J. Gen. Virol.*, vol. 70, págs. 543-555, han expresado secuencias codificantes de proteína de cápside recombinante en sistemas procariotas y usado las mismas en análisis de transferencia de Western de sueros obtenidos de individuos con infección de HPV del tracto genital. Los resultados de estos estudios han sugerido que los anticuerpos para epítopos desnaturizados, es decir lineales de proteínas de cápside de HPV se pueden detectar en los sueros de algunos individuos infectados.

Las partículas de virus completo también se han usado para detectar anticuerpos en sueros humanos, incluyendo anticuerpos dirigidos contra epítopos conformacionales. Estos estudios han sido difíciles de realizar debido a que la mayoría de las lesiones inducidas por HPV que tiene origen natural producen pocas partículas. Sin embargo, las partículas de virus completas se pueden obtener en cantidades suficientes para realizar ensayos inmunológicos de verrugas plantares inducidas por HPV de tipo 1 (Kienzler et al., "Humoral and cell-mediated immunity to human papillomavirus type 1 (HPV-1) in human warts," 1983, *Br. J. Dermatol.*, vol. 108, págs. 65-672; Pfister et al., *Seroepidemiological studies of human papilloma virus (HPV-1) infections*, 1978, *Int. J. Cancer*, vol. 21, págs. 161-165; y Steele et al., "Humoral assays of human sera to disrupted and nondisrupted epitopes of human papillomavirus type 1," 1990, *Virology*, vol. 174, págs. 388-398) y xenoinjertos de ratón actínico de HPV-11 inducido experimentalmente (Kreider et al., "Laboratory production *in vivo* of infectious human papillomavirus type 11," 1987, *J. Virol.*, vol. 61, págs. 590-593; y Kreider et al., "Morphological transformation *in vivo* of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata," 1985, *Nature*, vol. 317, págs. 639-641). Más particularmente, la Patente de Estados N° 5.071.757 de Kreider et al., describe un método de propagación de viriones de HPV-11 infecciosos en el laboratorio usando un sistema de modelo de xenoinjerto de ratón atílico. Aunque este sistema es capaz de producir cantidades de virus infecciosos que se podrían usar para el desarrollo de un ensayo serológico para la infección por HPV genital, este sistema es muy costoso y engorroso. Además, hasta ahora solamente un tipo de HPV genital se ha propagado en ese sistema, por tanto, limitando su utilidad. Además, el virus infeccioso producido usando este sistema representa un riesgo biológico y, por lo tanto, sería difícil de usar una formulación de vacuna.

Zhou et al., en "Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles", 1992, *Virology*, vol. 185, págs. 251-257, han descrito la formación de partículas de tipo virus de HPV-16 en núcleos de células CV-1 después de la infección por un vector de expresión

recombinante doble de L1/L2 de HPV-16 de virus vaccinia. Sin embargo, los autores no fueron capaces de producir las VLP con un vector que exprese solamente L1. Además, las VLP producidas carecían de una simetría bien definida y eran más viables en tamaño y menores, solamente de aproximadamente 35-40 nm de diámetro que los viriones de HPV (55 nm) o las VLP de la presente invención (las VLP de HPV-11 producidas por baculovirus, de aproximadamente 50 nm de diámetro).

La Patente de Estados Unidos Nº 5.045.447, de Minson, describe un método de exploración de sobrenadantes de cultivo de hibridoma para anticuerpos monoclonales con especificidades deseadas. El método de Minson se ilustra mediante la producción de anticuerpos para la proteína L1 del papilomavirus de tipo 16 (HPV-16) usando esta proteína como el antígeno diana en ratones. Sin embargo, Minson no consigue describir la expresión de la proteína L1 o la producción de partículas de tipo virus (VLP) de HPV.

La Patente de Estados Unidos Nº 4.777.239, de Schoolnik et al., describe secuencias peptídicas cortas obtenidas de varias de las fases de lectura abierta de la región temprana de papilomavirus que provocan anticuerpos específicos de tipo para papilomavirus. Sin embargo, los inventores no consiguen describir ninguna secuencia dirigida a la fase de lectura abierta tardía principal L1.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.057.411 de Lancaster et al., describe una secuencia polinucleotídica de aproximadamente 30 nucleótidos de la fase de lectura abierta de la proteína de cápside L1 de papilomavirus que los inventores afirman que codifica un epítopo específico de tipo de papilomavirus. Sin embargo, los inventores no describen animales infectados que produzcan anticuerpos que reconozcan esta secuencia. En lugar de esto, sintetizaron una versión de papilomavirus bovino de tipo 1 (BPV-1) de la secuencia (un péptido de 10 aminoácidos o decapéptido), después inmunizaron conejos y ensayaron la capacidad del antisero de reaccionar con tejido de fibropapiloma inducido con BPV-1 o BPV-2. El antisero peptídico reaccionó solamente con tejido de BPV-1 y no BPV-2. Después, los inventores llegaron a la conclusión de que el péptido contenía un determinante antigenico que era específico de tipo y, por lo tanto, todas las secuencias codificantes de L1 de papilomavirus contenían un epítopo específico de tipo en este locus. Esto es una especulación teórica por parte de los inventores, que no proporcionan datos para apoyar esta hipótesis. Además, generalmente se piensa que las secuencias de aminoácidos descritas (10 aminoácidos) no pueden adoptar estructuras antigenicas de orden superior, es decir, epítopos conformacionales que posean una estructura tridimensional tal como la producida mediante el método descrito en este documento.

Otro problema asociado con infecciones por papilomavirus es la necesidad de modalidades terapéuticas y profilácticas alternativas. Una de tales modalidades, que ha recibido un pequeño estudio reciente, sería las vacunas de papilomavirus. En 1944, Biberstein trató pacientes con condiloma acuminatum con una vacuna autógena obtenida de las verrugas de los pacientes (Biberstein, "Immunication therapy of warts," Arch. Dermatol Syphilol, 1944, vol. 50, pp. 12-22). Después de esto, Powell et al., desarrollaron la técnica usada típicamente en la actualidad para preparar vacunas para verrugas autógenas para el tratamiento de condiloma acuminatum (Powell et al., "Treatment of condylomata acuminata by autogenous vaccine," 1970, South Med. J., vol. 63, págs. 202-205). Tan sólo un estudio doble enmascarado, controlado con placebo ha intentado evaluar la eficacia de la vacuna autógena (Malison et al., "Autogenous vaccine therapy for condyloma acuminatum: A double-blind controlled study," 1982, Br. J. Vener. Dis., vol. 58, págs. 62-65). Los autores llegaron a la conclusión de que la vacunación autógena no era eficaz en el tratamiento de condiloma acuminatum, aunque esta interpretación puede ser errónea. Un pequeño número de pacientes estudiados impidió extraer conclusiones negativas válidas. En cualquier caso, las vacunas autógenas, tal como se describen actualmente, tienen diversas desventajas. En primer lugar, el paciente tiene que tener verrugas relativamente grandes (de 2 g a 5 g) para preparar la vacuna. En segundo lugar, el médico necesita acceder a equipamiento de laboratorio y adiestramiento cada vez que se tiene que tratar a un nuevo paciente. Por lo tanto, la preparación de vacunas es muy costosa, tediosa y en casos implica masivas lesiones relativamente pequeñas, no posibles.

El documento WO93/02184 pretende describir un método para proporcionar partículas de tipo virus de papiloma. Desgraciadamente, los métodos tradicionales de propagación de virus todavía no se han adaptado al estudio de los papilomavirus y los métodos alternativos que se han descrito previamente no consiguen producir viriones infecciosos en ninguna cantidad significativa para estudios inmunológicos. Además, la propagación *in vivo* de HPV-11 en el sistema de ratón atílico no es muy práctica debido a que es cara, laboriosa trabajosa y actualmente está limitada a HPV-11. Por consiguiente, se necesita un método alternativo de producción de epítopes de cápside de HPV para el uso en estudios inmunológicos y en la producción de vacunas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método de expresión de la secuencia codificante de proteína de cápside de papilomavirus (PV) en una célula, que comprende transfectar la célula con un vector de expresión que contiene la secuencia codificante de proteína de cápside de papilomavirus en condiciones que faciliten la expresión de la proteína en la célula. El papilomavirus es cualquiera de HPV-18, HPV-31, HPV-33 y HPV-35.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una partícula (o partículas) de tipo virus como (VLP), un fragmento (o fragmentos), un capsómero (o capsómeros) o una parte (o partes) de los mismos, formados por proteína de cápside de papilomavirus. Se ha descubierto que la partícula (o partículas) de tipo virus comprende una característica (o características) antigenicas similares a las de las partículas de papilomavirus infecciosas nativas.

La descripción describe (pero no como parte de la invención como tal) un método de expresión de la secuencia codificante de proteína de cápside L1 de papilomavirus humano de tipo 6 (HPV-6) y de tipo 11 (HPV-11) en células de insecto Sf-9 usando el sistema de expresión de baculovirus. Las secuencias codificantes de HPV-6 y HPV-11 se clonaron usando técnicas convencionales en la técnica en un vector de transferencia de baculovirus. El vector de transferencia de baculovirus resultante se usó para co-transfectar células de insecto Sf-9 con virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) formando un baculovirus recombinante (Ac6L1 o Ac11L1) que se recuperó. Despues de esto, las células de insecto Sf-9 se infectaron con Ac6L1 o Ac11L1 en condiciones que facilitaban la expresión de la proteína en las células. Se descubrió que la proteína L1 formó partículas de tipo virus (VLP). Las VLP se identificaron mediante microscopía electrónica de fracciones de banda de sacarosa teñida negativamente obtenida de células Sf-9 infectadas por el baculovirus recombinante Ac11L1. Se descubrió adicionalmente que las VLP poseían características inmunológicas y morfológicas similares a las de viriones de HPV-11 nativos, como se define por antisueros de conejo.

La partícula (o partículas) de tipo virus producida de acuerdo con la invención, se puede usar en ensayos de diagnóstico, puede desempeñar un papel en la identificación y caracterización de un receptor de célula de HPV y se puede usar para el desarrollo de vacunas (tanto terapéuticas como profilácticas). Se entiende que el método como se describe en este documento para la producción de HPV-11 y HPV-6 se puede usar para producir reactivos inmunológicos similares de otros papilomavirus animales y/o humanos. Además, las VLP producidas de acuerdo con la invención proporcionarán abundantes reactivos con los que realizar estudios inmunológicos de papilomavirus y para desarrollar vacunas contra papilomavirus.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En el sentido de que cualquier figura se refiere a un HPV diferente a HPV-18, HPV-31, HPV-33 y HPV-35, no forma parte de la invención reivindicada como tal que se refiere a dichos tipos de HPV. La Figura 1A muestra un gel de poliacrilamina de SDS teñido con azul de Coomassie de lisados de células Sf-9 infectadas por AcNPV de tipo silvestre y Ac11L1 recombinante.

25 La Figura 1B muestra una transferencia de Western de lisados de células SF-9 infectadas por AcNPV de tipo silvestre y Ac11L1 recombinante sondadas con antisero polyclonal de conejo específico para epítopo común de L1 de HPV.

30 La Figura 2 muestra una microfotografía electrónica de partículas de tipo virus de HPV-11 recuperadas por centrifugación de densidad en sacarosa de células Sf-9 infectadas por Ac11L1. Las VLP mostradas tienen aproximadamente 52 nm de diámetro (realizadas a escala por patrones de aumento) y poseen simetría icosaédrica, coherente con las observaciones publicadas con respecto a las características morfológicas de papilomaviriones de origen natural.

35 La Figura 3 muestra comparaciones de transferencia de Western y de inmunotransferencia puntual de inmunorreactividades de antisueros de conejo con L1 recombinante. En el panel A, el lisado de células de insecto de L1 recombinante se sometió a transferencia de Western en condiciones desnaturalizantes. En el panel B, los lisados de células de insecto de L1 no recombinante (+) o recombinante (L1) se aplicaron a una membrana de transferencia en condiciones no desnaturalizantes. Las tiras A se sondaron con un anticuerpo polyclonal de conejo específico para el epítopo común de L1 de HPV; las tiras B se sondaron con antisero polyclonal de conejo específico para la secuencia de aminoácidos amino terminal de L1 de HPV; las tiras C se sondaron con un antisero de partícula de virus completo polyclonal de conejo.

40 La Figura 4 muestra un ensayo de transferencia de Western usando lisados de célula de insecto de L1 recombinantes. Las tiras A-X se corresponden a diferentes anticuerpos primarios usados (las tiras A y B se hicieron reaccionar con antisueros anti-partículas de virus completo pre- y post-inmune de conejo, respectivamente; la tira C se hizo reaccionar con antisero anti-epítopo común de L1 desnaturizado post-inmune de conejo; las tiras D-O se hicieron reaccionar con sueros de pacientes con condiloma acuminatum; las tiras P-X se hicieron reaccionar con sueros de control).

45 La Figura 5 muestra un ensayo de inmunotransferencia puntual usando lisados de células de insecto. Las letras por encima de las tiras se corresponden a diferentes anticuerpos primarios usados, que eran los mismos que los descritos en la Figura 4.

50 La Figura 6 es una microfotografía electrónica de VLP de HPV de tipo 6, producidas mediante la construcción y expresión de un baculovirus recombinante de L1 de HPV-6 (Ac6L1).

La Figura 7 es una microfotografía electrónica de VLP de HPV de tipo 16, producidas mediante la construcción y expresión de un baculovirus recombinante de L1 de HPV-66 (Ac16L1).

La Figura 8 muestra la serorreactividad de pacientes con condiloma acuminatum a VLP de L1 de HPV-11.

55 La Figura 9 muestra correlación entre las serorreactividades de viriones y VLP de HPV-11.

La Figura 10(a) muestra una transferencia de Western (panel izquierdo) de proteínas L1 de HPV-11 (Carril 2) y L1 de HPV-16 (Carril 3). Los marcadores de referencia molecular están a la izquierda, la flecha indica las posiciones aproximadas de las proteínas L1 recombinantes de HPV-11 y HPV-16.

5 La Figura 10(b) es una inmunotransferencia puntual (panel derecho) en la que el Carril 1: AcNPV (muestra infectada por baculovirus de tipo silvestre); Carril 2: Ac11L1 (muestra infectada por Ac1L1 recombinante); Carril 3: Ac16L1 (muestra infectada por Ac16L1 recombinante).

10 La Figura 11 muestra la detección mediante SDS Page e inmunotransferencia de Western de L1 de HPV-11 recombinante en el sobrenadante de cultivo de células Sf-9 infectadas por Ac11L1 (Panel A; SDS Page (teñido con Coomassie); Panel B: transferencia de Western, usando el suero de antígeno común de PVL1; Carril 1: sedimento de alta velocidad de sobrenadante de cultivo de células infectadas por AcNPV no recombinante; Carril 2: sedimento de alta velocidad de sobrenadante de cultivo de células Sf-9 infectadas por Ac11L1; los marcadores de peso Molecular (M_r) están a la izquierda; la flecha en la derecha indica la posición de L1 recombinante de M_r 55 kD.

15 La Figura 12 muestra a un análisis de microscopía electrónica de preparaciones de VLP sin procesar y purificadas con CsCl (A-VLP sedimentadas de sobrenadante de cultivo sin célula Sf-9 infectada por Ac11L1; VLP purificadas por B-Csc1; barra = 50 nm).

20 La Figura 13 muestra análisis de inmunotransferencia puntual de VLP recombinantes purificadas y viriones completos de HPV-11 (Carril 1: sueros pre-inmunes; carril 2: sueros post-inmunes; A-Conejo R-366, inmunizado con viriones completos de HPV-11 purificado; B-Conejo R-399, inmunizado con VLP de HPV-11 purificadas; Antígenos: VLP (partículas de tipo virus de L1 de HPV-11); WVP (partículas de virus completo de HPV-11)).

25 La Figura 14 muestra un análisis de transferencia puntual de diámetros geométricos medios (GMD) de xenoinjerto.

30 La Figura 15 muestra un inmunoensayo de transferencia de Western de preparaciones de VLP purificadas de HPV-11, HPV-16 y HPV-18 (Carril A, VLP de L1 de HPV-11; carril B, VLP de L1 de HPV-16; carril C, VLP de L1 de HPV-18).

35 La Figura 16 (A-C) muestra una microfotografía electrónica de VLP purificadas con cloruro de cesio obtenidas de HPV de tipos 11, 16 y 18. Las VLP se purificaron como se describe en la memoria descriptiva y se tiñeron negativamente con ácido fosfatúngstico al 2%. A) VLP de L1 de HPV-11; B) VLP de L1 de HPV-16; C) VLP de L1 de HPV-18; las barras se corresponden a 100 nm.

40 La Figura 17 muestra inmunorreactividades de antisueros post-inmunes de conejo de VLP con preparaciones de VLP homólogas y heterólogas. Antígenos: VLP de L1 de HPV-1, barras blancas; VLP de L1 de HPV-16, barras punteadas; VLP de L1 de HPV-18, barras negras. Antisueros: A) antisuero de conejo anti-antígeno común de PVL-1; B) antisuero de conejo de virión completo de HPV-11; C, D) de dos conejos inmunizados con VLP de L1 de HPV-11; E, F) de dos conejos inmunizados con VLP de L1 de HPV-16; G, H) de dos conejos inmunizados con VLP de L1 de HPV-18.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

45 La presente invención se refiere a un método de expresión de la secuencia codificante de proteína de cápside de papilomavirus en una célula usando el sistema de expresión de baculovirus en condiciones que faciliten la expresión de la proteína en la célula. En otro aspecto de la invención, se ha descubierto que la partícula (o las partículas) de tipo virus (VLP), fragmento (o fragmentos), capsómero (o capsómeros) o parte (o partes) de los mismos están formados por la proteína de cápside de papilomavirus. Se descubrió adicionalmente que la partícula (o partículas) de tipo virus comprende características antigenicas similares a las de partículas de papilomavirus infecciosas nativas.

50 El papilomavirus es cualquiera de HPV-18, HPV-31, HPV-33 y HPV-35. Como se usa en este documento, "partícula (o partículas) de tipo virus (VLP)" se refiere a una partícula (o partículas) de tipo virus, fragmento (o fragmentos), capsómero (o capsómeros) o parte (o partes) de los mismos producidos por la secuencia codificante de proteína de cápside de papilomavirus y que comprende características antigenicas similares a las de partículas de papilomavirus infecciosos. Como se usa en este documento, "características (o características) antigenicas" se refiere (1) a la capacidad de la partícula (o partículas) de tipo virus de presentar reacción cruzada con partículas de tipo silvestre (partículas de virus infeccioso nativo del mismo tipo de HPV) como se determina mediante antisueros generados en animales y/o humanos por inmunización con las VLP o virus infecciosos; y/o (2) a la capacidad de reconocer o de detectar anticuerpos en sueros humanos de personas que se sabe que están infectadas por virus homólogos.

55 Como se usa en este documento, "secuencia codificante de proteína L1" o "secuencia codificante de proteína de cápside L1" o "secuencia codificante de L1" se refiere a la fase de lectura abierta que codifica la proteína L1 en papilomavirus. Cuando se expresa, la secuencia codificante de proteína L1 produce una proteína, o complejo proteico, o agregado que posee características inmunológicas y morfológicas similares a las de los viriones de papilomavirus nativos. La secuencia codificante de L1 usada en la invención se puede aislar y purificar a partir de ADN genómico de papilomavirus o sintetizar usando técnicas de ingeniería genética convencionales.

Como se usa en este documento, el término “transfectar” se refiere a cualquier medio para introducir un virus, plásmido o vector en una célula. Los ejemplos de tales medios se incluyen infección, precipitación con fosfato cálcico y electroporación.

La descripción describe (pero no como parte de la invención como tal) un método de expresión de la secuencia codificante de la proteína de cápside L1 del papilomavirus humano de tipo 11 (HPV-11) o papilomavirus humano de tipo 6 (HPV-6) en células de insecto Sf-9 usando el sistema de expresión de baculovirus. Se entiende que las secuencias codificantes de proteínas de cápside de estos tipos de HPV se usan únicamente con fines de la ilustración y que para los papilomavirus humanos de tipos 18, 31, 33 y 35, se usa una secuencia codificante de proteína de cápside L1 (Gissman et al., *Cancer Cells*, 1987, vol. 5, pág. 275).

El sistema de expresión preferido usado en el método de la invención es el sistema de expresión de baculovirus, sin embargo, se entiende que se puede emplear cualquier otro sistema (o sistemas) de expresión en este documento suponiendo que el sistema (o sistemas) puedan expresar la secuencia codificante de proteína L1. Los ejemplos de tales sistemas incluyen, sin limitación, cualquier sistema (o sistemas) procariota y/o eucariota incluyendo adenovirus, SV40, *E. coli*, March 9, células 1993CHO, virus vaccinia, virus de insecto, levadura, virus bacteriófago o virus modificados, plásmidos de ADN, vectores y similares. La célula hospedadora para la expresión de la secuencia codificante de L1 depende del sistema de expresión usado. Los ejemplos de células hospedadoras adecuadas incluyen, sin limitación, bacterias (procariotas), microorganismos tales como levaduras, células de mamífero (eucariotas) y células de insecto. Cuando se usa el sistema de expresión de baculovirus se prefieren células de insecto tales como Sf-9 o Sf-21.

En otro aspecto de la invención, se descubrió que la proteína L1 producía partículas de tipo virus (VLP), fragmento (o fragmentos), capsómero (o capsómeros) o parte (o partes) de las mismas, formadas por proteína de cápside de papilomavirus. Se ha descubierto que la partícula (o partículas) de tipo virus comprende característica (o características) antigenicas similares a las de partículas de papilomavirus infecciosas nativas. Más particularmente, estas VLP contienen un determinante antigenico que se reconoce específicamente mediante anticuerpos presentes en sueros obtenidos de pacientes infectados por HPV genital. Por ejemplo, la reacción de extractos de células de insecto que contienen VLP con antisueros dirigidos contra epítopos de cápside desnaturalizados o no desnaturalizados, como se deduce por inmunorreactividades en ensayos de transferencia de Western e inmunotransferencia puntual, sugirió que los epítopos conformacionales presentes en viriones infecciosos de HPV-11 nativos también estaban presentes en las VLP de HPV-11 producidas en baculovirus. Sin embargo, las VLP de HPV-11, no son parte de la invención como tal. Los ensayos de inmunotransferencia puntual usando sueros humanos obtenidos de individuos con condilomata acuminatum analizado por biopsia se correlacionaron estrechamente con los resultados obtenidos previamente en ensayos ELISA basados en partículas de virus completo de HPV-11 como describen Bonnez et al., “Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata,” 1991, *J. Gen. Virol.*, vol. 72, págs. 1343-1347.

Estas similitudes morfológicas e inmunológicas con viriones de HPV-11 nativo sugieren que las VLP recombinantes producidas en el sistema de baculovirus serán útiles en estudios de sero-epidemiología y patogenia no solamente de la infección por HPV genital sino también para cualquier papilomavirus y para el desarrollo de vacunas. La L1 tiene una capacidad intrínseca de auto-ensamblaje. Por tanto, otras proteínas de papilomavirus no se requieren para la formación de VLP en el sistema de baculovirus. Esto respalda el argumento de que las VLP para todos los tipos de papilomavirus se pueden producir de acuerdo con el método descrito en este documento.

Las VLP de la invención se pueden usar para generar anticuerpos, en sujetos para los que se desea protección contra infección por HPV, es decir, vacunas, o para intensificar la respuesta inmune frente a una infección por HPV ya presente. Las VLP de la invención se pueden inyectar en especies animales para obtener antisueros útiles en diagnóstico. Además de los antisueros policlonales, se pueden obtener anticuerpos monoclonales usando los métodos de Kohler y Milstein o por modificaciones de los mismos, inmortalizando células de bazo u otras células productoras de anticuerpos de animales inyectados para obtener clones productores de anticuerpos, es decir, hibridomas.

Los anticuerpos obtenidos se pueden usar para el diagnóstico de infección por HPV en biopsias cervicales o frotis de Papanicolaou y para ensayar niveles de enfermedad en seres humanos u otros sujetos. En particular, el diagnóstico usando los anticuerpos de la invención permite el control de la evolución de la enfermedad. Los anticuerpos se pueden usar en análisis de suero para detectar el virus así como para controlar el avance de la terapia con agentes antivirales u otros terapéuticos dirigidos para controlar la infección o el carcinoma. Los anticuerpos también se pueden usar como terapia pasiva teniendo en cuenta las variaciones de especie.

Las VLP de la invención se pueden usar en inmunoensayos para detectar la presencia de anticuerpos generados contra HPV en suero de pacientes sospechosos de albergar infecciones por HPV o para titular los sueros de pacientes que se están tratando con una vacuna anti-HPV.

Las VLP de la invención se pueden administrar directamente a un hospedador para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes (Bonnez et al., 1992, citado a lo largo de este documento; y Rose et al., en prensa, citado a lo largo de este documento), para otorgar inmunidad protectora contra HPV o, si el paciente ya está infectado, para reforzar la propia respuesta inmune del paciente. Para todas las aplicaciones, las VLP se administran en forma inmunógena. Opcionalmente, las VLP se pueden conjugar con un material de vehículo que otorga inmunogenicidad,

siendo el material preferiblemente antigenicamente neutro. Dependiendo del uso requerido, las VLP de la invención tienen la capacidad de servir como vacunas y diagnósticos específicos de sitio o de amplio intervalo.

Las VLP que se tienen que administrar como vacunas se pueden formular de acuerdo con métodos convencionales y/o futuros para tal administración al sujeto a proteger y se pueden mezclar con adyuvantes convencionales. El péptido expresado se puede usar como un inmunógeno en formulaciones de vacunas de subunidades, que pueden ser polivalentes. La formulación de vacuna polivalente puede comprender cada una de las VLP que codifican una proteína L1 diferente de diferentes HPV. El producto se puede purificar con fines de formulación de vacunas de cualquier sistema de vector/hospedador que exprese la proteína heteróloga. Las VLP purificadas deben ajustarse a una concentración apropiada, formularse con cualquier adyuvante de vacuna adecuado y envasarse para su uso. Los adyuvantes adecuadas incluyen, pero sin limitación: geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias con actividad superficial tales como lisolecitina, polioles de pluronic; polianiones; péptidos; emulsiones de aceite; y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. El inmunógeno también se puede incorporar en liposomas o conjugar con polisacáridos y/u otros polímeros para el uso en una formulación de vacuna. Se pueden usar muchos métodos para introducir las formulaciones de vacuna que se han descrito anteriormente; las mismas incluyen, pero sin limitación, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intranasal. Si se tienen que usar directamente, como reactivos de diagnóstico, se purifican usando métodos convencionales y se envasan de forma apropiada para tal uso. Si se tienen que usar para producir anticuerpos para fines de diagnóstico se pueden usar animales de ensayo adecuados para preparar los antisueros apropiados. Los huéspedes adecuados incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas o incluso mamíferos más grandes tales como ovejas. Los anticuerpos se pueden usar terapéuticamente siempre que sean compatibles con el hospedador a tratar. Para esta solicitud, se prefieren los anticuerpos monoclonales con las características de especie apropiadas.

Para ilustrar adicionalmente la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos.

En la medida en que cualquier ejemplo o parte de un ejemplo se refiere a un HPV diferente de HPV-18, HPV-25, 31, HPV-33 y HPV-35 no forma parte de la invención reivindicada como tal.

EJEMPLO I

Métodos

1. ADN viral de HPV-11 y construcción del vector de transferencia de baculovirus pVL11L1.

Se obtuvo ADN genómico de HPV-11 de partículas de virus que se purificaron de xenoinjertos de ratones atípicos inducidos experimentalmente como describen Rose et al., "Expression of the full-length products of the HPV-6b and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus, and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles," 1990, J. Gen. Virol., vol. 71, págs. 2725-2729. La secuencia codificante L1 se clonó mediante amplificación por PCR de ADN genómico purificado, usando cebadores diseñados para introducir sitios de enzima de restricción *Bg*II y *Eco*RI y en los extremos 5' y 3', respectivamente. Las secuencias de cebador directo e inverso, respectivamente, eran 5'-CGC AGA TCT ATG TGG CGG CCT AGC-3' (SEC ID N°: 1) y 5'-CAT ATG AAT TCC CAC AAC ACA CTG ACA CAC-3' (SEC ID N°: 2). Se introdujeron sitios de restricción (subrayados) de forma proximal al supuesto codón de inicio L1 (texto en negrita) y aproximadamente 30 nucleótidos cadena abajo del supuesto codón de terminación de L1 mediante mutagénesis dirigida por cebador. La amplificación se realizó esencialmente como describen Bonnez et al., "Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction," 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380, usando 500 ng de cada cebador y 2 unidades de ADN polimerasa de *Taq* (AmpliTaq, Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT). Después de la amplificación, el producto de la PCR se digirió con *Bg*II y *Eco*RI. El producto de digestión de 1539 de pares de bases (pb), que contenía toda la fase de lectura abierta (ORF) de L1 de HPV-11 se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa como describen Rose et al., "Expression of the full-length products of the HPV-6b and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus, and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles," 1990, J. Gen. Virol., vol. 71, págs. 2725-2729, y se clonó en los correspondientes sitios de un vector de transferencia de baculovirus, pVL-1392 (M.D. Summers, Texas A&M University, College Station, TX). La construcción resultante, pVL11L1, se usó para co-transfectar células Sf-9 con ADN genómico de virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) de acuerdo con los métodos de Summers et al., A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, 1987, Texas A&M University, College Station, Texas. Se recuperaron baculovirus recombinantes mediante examen visual y selección de placas negativas a oclusión (occ-) y se sometieron a dos rondas adicionales de purificación en placa de acuerdo con los métodos de Summers et al., A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, 1987, Texas A&M University, College Station, Texas. La expresión de proteína de soluciones madre de virus aislado se determinó mediante transferencia de Western.

55 2. Detección por SDS-PAGE y transferencia de Western de la expresión de L1_recombinante en células Sf-9.

Se cultivaron cultivos de células Sf-9 infectadas en matraces de cultivo tisular de 150 cm² y se prepararon para ensayo analítico de SDS-PAGE y transferencia de Western. Se recogieron de los matraces, células infectadas por L1 no recombinantes o recombinantes, resuspendiendo con una pipeta de Pasteur y se centrifugó el mismo número de células infectadas por L1 de tipo silvestre o recombinante a 500 x g durante 10 minutos a 4°C. Se retiraron los sobrenadantes y los sedimentos celulares se transfirieron a hielo, se resuspendieron inmediatamente en 1 ml de tampón de lisis (Tris 30

5 mM, pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; CaCl₂ 1 mM; fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF) 1 mM; leupeptina (10 µg/ml); NP-40 al 1%) y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación vortical periódica. Después de la centrifugación a 500 x g durante 2 minutos a 4°C, la fracción soluble en NP40 contenida en el sobrenadante se retiró y se diluyó 1:1 con tampón de muestra Laemmli 2X como describe Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4," 1970, Nature, vol. 277, págs. 680-685, y se calentó a 95°C durante 3 minutos. El sedimento insoluble en NP40 (que contenía material nuclear) se lavó una vez con PBS frio (PMSF 1 mM: 10 µg/ml de leupeptina) y se solubilizó llevando a ebullición y agitando vorticialmente en tampón de Laemmli 1X. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de SDS poliacrilamida al 10%, seguido por tinción con azul de Coomassie (Figura 1, panel A) o transferencia (Figura 1, panel B) a una membrana Immobilon-P (Millipore Corp., New Bedford, MA) como describen Rose et al., "Expression of the full-length products of the HPV-6b and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus, and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles," 1990, J. Gen. Virol., vol. 71, págs. 2725-2729.

3. Preparación de soluciones madre de L1 no recombinante y recombinante.

15 Estos ensayos se realizaron usando diluciones de soluciones madre del sobrenadante clarificado (alta velocidad) preparadas a partir de extractos de células de insecto infectadas por AcNPV o Ac11L1. Los cultivos de suspensión (100 ml) de células Sf-9 infectadas por AcNPV o Ac11L1 a una multiplicidad de infección aproximada de 10 unidades formadoras de placas por células se incubaron a 27°C durante 72 horas. Después, los cultivos se centrifugaron a 1.000 x g durante 10 minutos a 4°C y los sedimentos celulares se resuspendieron en 20 ml de tampón de homogeneización (tampón de lisis con NaCl 1 M) y se homogeneizaron con 50 impulsos en un homogeneizador Dounce en hielo. Los homogenizados se transfirieron a tubos Corex de tapón de rosca de 30 ml fríos y se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Después, las fracciones de sobrenadante de baja velocidad se transfirieron a un tubo limpio y se centrifugaron a 100.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Las concentraciones de proteína total de las fracciones de sobrenadante de alta velocidad se midieron mediante absorción espectrofotométrica a 280 nm de acuerdo con el procedimiento de Stoscheck, "Quantitation of proteins," 1990, in Methods in Enzymology, vol. 182, pág.54. Academic Press, Inc., New York y se ajustaron a la equivalencia con tampón de homogeneización recién preparado (concentraciones de proteína aproximadamente iguales a 30 mg/ml). Se añadió glicerol al 10% (v/v) y las soluciones madre se dividieron en alícuotas y se conservaron a -20°C.

4. Ensayos de transferencia de Western y de inmunotransferencia puntual.

30 Se usaron ensayos de transferencia de Western y de inmunotransferencia puntual para determinar las especificidades de anticuerpo de epítopo lineal y conformacional en antisueros de conejo y sueros humanos. Los ensayos de transferencia de Western (Fig. 3, panel A, y Fig. 4) se realizaron usando 2 µl (aproximadamente 60 µg de proteína total) de solución madre de L1 recombinante diluida 1:100 con tampón de muestra de Laemmli 1X, que contenía reactivos de desnaturización de proteína como describen Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4," 1990, Nature, vol. 277, págs. 680-685, y se calentaron a 95°C durante 3 minutos. La muestra desnaturizada se cargó en un solo pocillo de muestra de 100 mm de anchura, se sometió a electroforesis en un gel de SDS poliacrilamida al 10% y se transfirió a una membrana Immobilon-P. Después de bloquear con una solución de BSA al 2% (Kirkegaard y Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD) durante 2 horas a 37°C, la membrana se cortó en tiras de 24,4 mm de anchura, que contenían cada una aproximadamente 2,5 µg de proteína total. Después de esto, las tiras se sondaron con antisueros (Fig. 3, panel A, y Fig. 4).

40 Para los análisis de inmunotransferencia puntual se diluyeron soluciones madre de L1 no recombinante o recombinante 1:1.000 con PBS frio (CaCl₂ 1 mM) y se aplicaron puntualmente alícuotas de 100 µl (que contenían aproximadamente 3,0 µg de proteína total) sobre una membrana de Immobilon-P. Los reactivos de desnaturización de proteínas se omitieron de la preparación de muestra de inmunotransferencia puntual para conservar la conformación nativa de L1 recombinante. Las soluciones de diluyente de bloqueo, anticuerpo primario y secundario, lavados y sustrato usados son como describieron Strike et al., "Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen)," 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555. Las incubaciones de anticuerpo primario se realizaron durante una noche a 4°C, las incubaciones del segundo anticuerpo se realizaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. Para las inmunotransferencias puntuales, todas las soluciones excepto la solución de sustrato contenían CaCl₂ a 1 mM. Las diluciones de anticuerpo primario eran 1:2.000 para antisueros de conejo y 1:1.000 para sueros humanos. Los anticuerpos unidos específicamente se detectaron con conjugados de IgG purificados por afinidad anti-conejo (Kirkegaard y Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) o anti-ser humano (TAGO Immunodiagnostic, Burlingame, CA) con fosfatasa alcalina usados a diluciones de 1:2.000 y 1:5.000, respectivamente, usando BCIP/NBT (Kirkegaard y Perry Laboratories, Inc.) como sustrato. Las reacciones de inmunotransferencia puntual se evaluaron mediante comparación visual de intensidades de punto de L1 no recombinante y recombinante. Se consideró que una reacción era positiva si la intensidad del color del punto de L1 recombinante era mayor que la intensidad de color del punto de control no recombinante presente en la misma tira.

5. Antisueros.

60 El antisuero de L1 desnaturizado usado se describió previamente como anti-pEX480 por Strike et al., "Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen)" 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555.

Este antisuero se obtuvo mediante inmunización de conejo con una proteína de fusión expresada en bacteria purificada en gel que contenía una secuencia de 160 aminoácidos derivada de la región central de la fase de lectura abierta de L1 de HPV-6b fusionada con el extremo carboxi de betagalactosidasa, como describen Stanley et al., "Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: Identification of cDNA clones coding for human liver proteins," 1984, EMBO J., vol. 3, págs. 1429-1434; y Strike et al., "Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen)," 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555. Esta secuencia contiene el antígeno común de L1 de papilomavirus como describen Strike et al., "Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen)," 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555. El antisuero de partícula de virus completo de conejo usado fue como describieron Bonnez et al., "Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction," 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380 y se produjo por inmunización de conejos con viriones de HPV-11 no desnaturalizados purificados, que se obtuvieron de xenoinjertos de prepucio de ratón atípico de acuerdo con Bonnez et al., "Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction," 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380; y Kreider et al., "Laboratory production *in vivo* of infectious human papillomavirus type 11," 1989, J. Virol., vol. 61, págs. 590-593. Los sueros de los pacientes se obtuvieron de individuos con condiloma acuminatum analizado por biopsia. Se usaron muestras de suero, que se habían hallado previamente positivas por ELISA, basado en partículas de virus completo de HPV-11, como describieron Bonnez et al., "Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata," 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347, para maximizar la capacidad de detectar anticuerpos dirigidos contra las VLP. Los sueros de control se obtuvieron de monjas que declararon que no habían tenido ningún contacto sexual en su vida. Estos sueros eran negativos para anticuerpos de HPV-11 como se determinó por el ELISA basado en partícula de HPV-11 como describieron Bonnez et al., "Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata," 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347.

6. Producción y purificación de las partículas de tipo virus de L1 de HPV-11.

Las VLP recombinantes se purificaron directamente a partir del sobrenadante de cultivo acelular de cultivos en suspensión de células Sf-9 infectadas por Ac11L1 mediante una serie de etapas de centrifugación a baja y alta velocidad. Las células Sf-9 infectadas se sedimentaron a partir de un cultivo en suspensión de 200 ml de una baja velocidad ($1.000 \times g$) y el sobrenadante acelular se centrifugó de nuevo a alta velocidad ($100.000 \times g$) durante 90 minutos a 4°C . El sedimento de alta velocidad se resuspendió en tampón A (Tris 50 mM, pH 8.0; NaCl 1 M; MgCl₂ 10 mM; CaCl₂ 10 mM; fluoruro de fenilmetsulfonilo 2 mM (PMSF); 10 µg/ml de leupeptina), se añadieron 5,2 g de CsCl sólido y el volumen final se ajustó hasta un total de 13 ml con tampón A recién preparado (concentración final 0,4 g/ml). Después de la centrifugación ($100.000 \times g$, 22 horas, 10°C), la única banda obtenida se retiró y diluyó con 12 ml de tampón A recién preparado (sin CxCl) y se centrifugó de nuevo ($100.000 \times g$, 90 minutos, 4°C) para sedimentar las VLP purificadas. Las VLP purificadas mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa se identificaron mediante microscopía electrónica después de tinción con ácido fosfotúngstico tamponado neutro al 2% (Figs. 2, 6, y 7).

EJEMPLO II

Expresión y detección inmunológica de la proteína L1 de HPV-11 recombinante en células Sf-9

El análisis SDS-PAGE de proteínas de células Sf-9 totales de células de insecto infectadas por el virus recombinante Ac11L1 demostró una proteína de 55 kD novedosa observada mediante tinción con azul de Coomassie en células infectadas por Ac11L1 (Fig. 1A, carril 3). Con referencia a las Figuras 1 (A y B), la Fig. 1A muestra un gel de SDS de poliacrilamida teñido con Coomassie de lisados de células Sf-9 infectadas por AcNPV de tipo silvestre y Ac11L1 recombinante y la Fig. 1B muestra una transferencia de Western de lisados de células Sf-9 infectadas por AcNPV de tipo silvestre y Ac11L1 recombinante sondadas con un antisuero policlonal de conejo específico para el epítopo común de L1 de HPV. Los lisados de células Sf-9 infectadas por L1 no recombinante (carriles 1, 2) y recombinantes (carriles 3, 4) se fraccionaron en fracciones insolubles (carriles 1, 3) y solubles (carriles 2, 4) y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Los marcadores de referencia molecular (M_r) se presentan a la izquierda y la flecha a la derecha indica la posición aproximada de L1 recombinante (aproximadamente 55 kD de M_r). Esta proteína no está presente en lisados de AcNPV de tipo silvestre y co-migra con una proteína que es inmunorreactiva (Fig. 1B, carriles 3 y 4) con un antisuero de conejo preparado contra el antígeno común de L1 de HPV lineal como describieron Strike et al., "Expression in Escherichia coli of seven DNA segments comprising the complete L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 6b and the location of the (common antigen)," 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555. También se detectaron bandas inmunorreactivas con L1 de menor M_r y pueden derivar de la degradación del producto de L1 de longitud completa (Fig. 1B, carriles 3 y 4). Aunque la parte predominante de L1 producida en este sistema apareció en la fracción insoluble de NP-40, aproximadamente el 25-30% estaba presente en la fracción soluble de NP-40 (Fig. 1B, carril 4). La máxima acumulación de L1 tuvo lugar 72 horas después de la infección.

EJEMPLO III

Visualización de las VLP con microscopio electrónico

Las microfotografías electrónicas de preparaciones teñidas negativamente de las VLP en bandas de sacarosa

(Figs. 2, 6 y 7) mostraron distintas VLP. La Fig. 2 muestra partículas de tipo cápside de HPV-11 que estaban presentes en el 50-60% de la interfaz del gradiente de densidad en sacarosa. La Fig. 6 muestra partículas de tipo cápside de HPV tipo 6b (HPV-6b) que resultaban de la expresión de la secuencia codificante de L1 de HPV-6b en el sistema de baculovirus y que se purificaron exactamente del mismo modo. La Fig. 7 demuestra que este método también es adecuado para la producción de las VLP de HPV de tipo 16 (HPV-16), después de la expresión de la secuencia codificante de L1 de HPV-16. Las Figs. 12 y 16 demuestran que las VLP se pueden purificar también por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio. Los diámetros de partículas determinados por medición directa de las VLP en la Figura 2, eran aproximadamente de 52 nm. Esta medición concuerda con el diámetro de viriones aislados de papilomavirus como describieron Klug et al., "Structure of viruses of the papilloma-polyoma type I: Human wart virus," 1965, J. Mol. Biol., vol. 11, págs. 403-423.

EJEMPLO IV

Inmunorreactividad de extractos de célula de insecto que contienen las VLP de HPV-11 con antisueros de conejo

Se estudiaron las propiedades inmunológicas de la proteína L1 recombinante usando antisueros de conejo que reaccionaron con epítopos de proteína L1 nativos o desnaturalizados. El antisero de conejo pEX480, dirigido contra el antígeno de papilomavirus común, reaccionó bien con L1 recombinante desnaturalizada en ensayos de transferencia de Western, pero no reaccionó con la misma preparación de antígeno mediante inmunotransferencia puntual, un tipo de inmunoensayo en el que el antígeno se pone sobre la membrana de transferencia en condiciones no desnaturalizantes (Fig. 3, compárese con las tiras A). A diferencia del patrón del reactividad mostrado por anti-pEX480, el antisero policlonal de conejo generado contra partículas de virus completo de HPV-11 no reaccionó con L1 recombinante por transferencia de Western, pero reaccionó fuertemente con L1 recombinante en el ensayo de inmunotransferencia puntual (Fig. 3, compárese con las tiras C). Esta reactividad era específica como se demostró por la ausencia de reactividad en el suero post-inmune contra la preparación de control no recombinante nativa (Fig. 3, panel B, tira C). El antisero de conejo pEX215 se incluyó en estos inmunoensayos para permitir la comparación de las cantidades relativas de L1 presente en los dos tipos de inmunoensayos. El nivel de inmunorreactividad del antisero pEX215 con L1 recombinante en ambos formatos es aproximadamente equivalente (Fig. 3, tiras B), indicando que las cantidades de L1 presentes son aproximadamente iguales. Además, la observación de que este antisero es capaz de reaccionar con L1 en ambos formatos sugiere que el epítope (o epítopes) amino-terminales de L1 inmunoreactivos lineales reconocidos por el antisero pEX215 no está enmascarado por la adopción de una conformación de L1 de orden superior.

EJEMPLO V

Inmunorreactividad de extractos de célula de insecto que contiene VLP con sueros humanos

Para determinar el predominio de anticuerpos en sueros humanos dirigidos contra epítopos lineales frente a conformacionales, se evaluaron sueros obtenidos de individuos con condiloma acuminatum analizado por biopsia en ensayos de transferencia de Western e inmunotransferencia puntual usando las VLP como antígeno. Ninguno de los sueros de los pacientes o de control eran inmurreactivos con L1 recombinante desnaturalizada por transferencia de Western (Fig. 4, tiras de D-O (pacientes) y P-X (controles)). Por el contrario, 11 de los 12 sueros de pacientes (Fig. 5, las tiras D-O se leyeron como positivas, con la excepción de la tira H) y 0 de los 9 sueros de control (Fig. 5, tiras P-X) eran inmurreactivos con L1 recombinante por inmunotransferencia puntual, una diferencia estadísticamente muy significativa ($p = 7 \times 10^{-5}$; ensayo preciso de Fisher). Este resultado se correlaciona bien con los resultados obtenidos previamente usando los mismos sueros en un ELISA basado en partículas de HPV-11 como describen Bonnez et al., "Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata," 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347.

EJEMPLO VI

Ensayo de ELISA

Las VLP purificadas por CsCl se cuantificaron mediante un espectrofotómetro (A_{280}) y se diluyeron a una concentración de 8 ng/ μ l en PBS frío. Se cargaron alícuotas (100 μ l) de PBS o solución de VLP diluida (800 ng de proteína total) en pocillos y las placas se dejaron reposar durante una noche a 4°C. Las placas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con solución de BSA al 1%, seguido de la adición de antisueros por duplicado, a una dilución de 1:100. Los antisueros primarios se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 90 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces y se añadió anticuerpo secundario (conjugado de anti IgG humana de cabra con fosfatasa alcalina) (TAGO, 1:5000) y se dejó reposar a las placas a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se añadió sustrato a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 405 nm. La absorbancia específica se calculó restando la absorbancia de PBS de la absorbancia de VLP para cada réplica y calculando el valor de absorbancia promedio.

Los resultados obtenidos usando las VLP (Fig. 8) eran equivalentes a los resultados descritos previamente en un ensayo de ELISA de los mismos sueros (de pacientes de RRP), que usaron partículas de virus completo de HPV-11 como antígeno (50%). La buena correlación con resultados de un ELISA previo, basado en partícula de virus completo, se proporciona en la Fig. 9 ($r^2=0,75$).

EJEMPLO VII

Transferencia de Western e Inmunotransferencia Puntual

Se infectaron cultivos en suspensión de Sf-9 (100 ml) con baculovirus recombinante AcNPV (control no recombinante) Ac11L1 o Ac16L1 como describieron previamente Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944 y se incubaron durante 72 horas a 27°C. Con referencia a la Fig. 11, se prepararon las muestras, se sometieron a electroforesis y se realizó la inmunotransferencia como describieron previamente Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944; y Rose et al., 1990, J. Gen. Virol., vol. 71, págs. 2725-2729. Las VLP estaban presentes en ambas preparaciones de muestra, como se verificó mediante microscopía electrónica (datos no mostrados). Las concentraciones de proteína de muestra total se equilibraron antes del uso mediante un espectrofotómetro (A_{280}).

Con referencia a la Fig. 10(a), las muestras (20 µg de proteína total/carril) se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometieron a transferencia de Western durante una noche como describieron previamente Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380. La transferencia de nitrocelulosa se sondó con antisero de conejo R5-409, usado a una dilución de 1:1.000 como describieron Christensen et al., 1991, Virus Research, vol. 21, págs. 169-179. Como se muestra en la Fig. 10 (a) (panel izquierdo), se detectaron proteínas de L1 de HPV-11 recombinante (carril 2) y de L1 de HPV-16 recombinante aproximadamente en cantidades iguales mediante el antisero anti-epítopo común de L1 de papilomavirus R5-409. La secuencia de aminoácidos predicha de la proteína L1 de HPV-16 tiene cinco aminoácidos más de longitud que la secuencia predicha de la proteína L1 de HPV-11, lo que es coherente con la velocidad ligeramente menor de la migración mostrada por la proteína L1 de HPV-16 recombinante.

Con referencia en la Fig. 10(b), las muestras se diluyeron (diluciones en serie con factor 2 de dilución, realizadas con PBS) y se aplicaron a nitrocelulosa en condiciones no desnaturalizantes, comenzando con una concentración de proteína total de 25 µg (parte inferior) y finalizando con una concentración de proteína total de 25 ng (parte superior). El antisero de conejo R-366 se usó a una dilución de 1: 1.000. En el panel derecho (es decir, la inmunotransferencia puntual), el antisero de partícula de virus completo detectó la preparación de VLP de L1 de HPV-11 recombinante nativo a lo largo de un intervalo de dilución de 1.000 veces. Sin embargo, este mismo antisero de conejo hiper-inmune no era inmunorreactivo con la preparación de VLP de L1 de HPV-16 recombinante nativa, incluso a una concentración mayor de antígeno (25 µg) que la usada para el análisis mediante transferencia de Western (20 µg).

El antisero neutralizante de virión de HPV-11 nativo de conejo hiper-inmune no presentó reacción cruzada con la proteína L1 de HPV-16 nativa, sugiriendo que el epítopo (o epítopos) conformacionales de la cápside de HPV-11 que se reconoce por este antisero es inmunológicamente diferente de los epítopos conformacionales presentes en la preparación de VLP de HPV-16.

30 EJEMPLO VIII

Ensayo de Inmunotransferencia de Western

Las VLP se detectaron en, y purificaron directamente, del medio de sobrenadante de un cultivo en suspensión de células Sf-9 infectadas por Ac11L1 (200 ml). Las células se sedimentaron a baja velocidad (1.000 x g) y después el sobrenadante acelular se centrifugó a alta velocidad (100.000 x g). Las células se retiraron mediante centrifugación a baja velocidad (1.000 x g) y las VLP se prepararon a partir de sobrenadantes de cultivo como describieron previamente Rose et al. en "Human papillomavirus type 11 (HPV-11) virus-like particles (VLPs) induce the formation of neutralizing antibodies." (Submitted for publication) 1993. El panel A es un gel de SDS-poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. El panel B es una inmunotransferencia de Western de un gel cargado idénticamente, sondado con un anticuerpo de conejo específico para el antígeno común de HPV como describieron por Strike et al., 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555, usado a una dilución de 1:1.000. Los exámenes de los sedimentos de alta velocidad obtenidos de sobrenadantes de cultivo de células Sf-9 infectadas por L1 no recombinante o recombinante indicaron la presencia de las VLP en la fracción de sobrenadante infectada por L1 recombinante. El sedimento de alta velocidad de L1 recombinante resuspendido se purificó mediante centrifugación en gradiente de densidad de equilibrio como describieron previamente Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380. La única banda obtenida mediante este método se retiró con un aguja estéril del calibre 18, se diluyó con tampón A recién preparado (Tris 50 mM, pH 8,0; NaCl 1 M; MgCl₂ 10 mM; CaCl₂ 10 mM; fluoruro de fenilmetsulfonilo 2 mM (PMSF); 10 µg/ml de leupeptina) hasta un volumen de 12 ml y se volvió a centrifugar a 100.000 x g durante 90 minutos a 4°C. Después de la resuspensión del sedimento en 0,5 ml de tampón A recién preparado (glicerol al 50%), el análisis con microscopía electrónica de una parte de la muestra, teñida negativamente con ácido fosfatúngstico al 2%, confirmó la presencia de las VLP de HPV intactas (Fig. 12).

Como se describió previamente, las VLP recombinantes eran inmunorreactivas con anticuerpos dirigidos contra partículas de virus completo de HPV-11 (véase Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944.). En este estudio, los solicitantes inmunizaron conejos con VLP purificadas y ensayaron los sueros post-inmunes para inmunorreactividad con viriones completos. Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda por vía intramuscular en dos sitios con una emulsión 1:1 de VLP purificadas (~ 20 µg de proteína) en adyuvante completo de Freund (0,25 ml por sitio). Se administraron refuerzos después de 30 días con una emulsión de VLP preparada en adyuvante incompleto de Freund y los sueros inmunes se recogieron 14 días más tarde. Los sueros se hicieron reaccionar con viriones de HPV-11 nativos o VLP recombinantes en un inmunoensayo de transferencia puntual, como se describieron previamente Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944. Como se muestra en la Fig. 13, la reactividad cruzada inmunológica de anticuerpos anti-VLP con viriones completos, demuestra que las VLP son inmunogénicas y parecen replicar de forma

fiable el perfil antigenico de viriones de HPV-11 infecciosos. Con referencia a la Fig. 13, se aplicaron preparaciones de muestra purificada no desnaturalizada a nitrocelulosa como describieron Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944.

EJEMPLO IX

5 Actividad de neutralización

La preparación de la suspensión viral de HPV-11_{Hershey} de infección (proporcionada originalmente por John Kreider, Department of Pathology and Microbiology and Immunology, The Milton S. Hershey Medical Center, Hershey, PA.) se ha descrito por Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380. En cuatro experimentos paralelos se incubaron 450 µl de la suspensión viral de infección (lote 4/90) a 37°C durante 1 hora con 50 µl (1:10 de dilución final) de suero anti-HPV-11 pre-inmune (grupo 1), suero anti-HPV-11 post-inmune (grupo 2), suero anti-VLP pre-inmune (grupo 3) o suero anti-VLP post-inmune (grupo 4). Los grupos 1 y 2 eran controles de neutralización que habían descrito previamente Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380 y los grupos 3 y 4 eran los grupos de ensayo. La preparación de prepucios humanos extirpados por circuncisión rutinaria también se ha descrito por Bonnez et al., 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347. Los prepucios se cortaron en cuadrados de 1 x 1 mm y un pequeño número de fragmentos de cada prepucio usado se congeló instantáneamente y se guardó. Los restantes fragmentos se dividieron equitativamente en cuatro grupos y cada grupo se añadió a una de las cuatro mezclas de suero de suspensión viral al final del periodo de incubación. Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Para cada grupo experimental, se puso un fragmento de prepucio debajo de la cápsula renal de cada riñón de 3 ratones hembra, emparejadas por camada, de 4-6 semanas de edad *nu/nu* atípicas en un fondo de BALB/c (Taconic Farms, Germantown, NY). El experimento se repitió en un día diferente, con un prepucio diferente. Por tanto, para cada grupo experimental se implantó un total de 12 injertos. Los animales se sacrificaron 12 semanas después del injerto, momento en el cual se retiraron los injertos y se procesaron. (Véase Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380). Con referencia a la Fig. 14, los injertos se prepararon para el análisis como se describe en este documento y se infectaron con lisado viral que pre-trató con sueros de partículas de virus completo de HPV-11 de conejo (1) pre- y (2) post-inmune o sueros de partículas de tipo de virus de HPV-11 L1 de conejo (3) pre- y (4) post-inmune. Los círculos negros corresponden al primer experimento repetido, los círculos blancos al segundo experimento repetido. Las barras horizontales indican el GMD medio. Para la comparación del tamaño de injerto se calculó el diámetro medio geométrico (GMD) tomando la raíz cúbica del producto de la longitud, anchura y altura de los injertos recuperados.

En el momento de la eutanasia, faltaba un injerto de cada uno de los grupos tratados con anti-HPV-11 pre- y post-inmune de control de neutralización. Por tanto, el número de injertos disponible para el análisis en cada uno de estos grupos era de 11 (Fig. 14). Los GMD (mm) medios [intervalo] de los injertos en los grupos de control pre- y post-inmunes eran respectivamente 2,9 [1,0, 4,9] y 1,3 [1,0, 2,6]. La diferencia, 1,6 mm era estadísticamente significativa ($P = 0,004$, ensayo U de Mann-Whitney). Los 12 injertos implantados estaban disponibles para el análisis en los grupos tratados con anticuerpo-anti-VLP pre- y post-inmunes (Fig. 4). Los GMD (en mm) medios [intervalo] de los injertos eran respectivamente 2,3 [1,3, 4,2] y 1,0 [1,0, 1,8]. La diferencia de tamaño, 1,3 mm, era estadísticamente significativa ($p < 10^{-4}$). Aunque la diferencia en los tamaños de injerto entre el primer y segundo experimento no era estadísticamente significativa ($P = 0,62$) en el grupo pre-inmune, era significativa ($P = 0,007$) en el grupo post-inmune. Por lo tanto, los solicitantes compararon las diferencias en los tamaños de injerto entre los grupos tratados con anticuerpo anti-VLP pre- y post-inmune con cada experimento repetido. Ambas eran estadísticamente significativas ($P = 0,002$ y $P = 0,04$ respectivamente para la primera y segunda repetición).

EJEMPLO X

Fuente de ADN Virales

Se ha descrito la fuente de ADN genómico de HPV-11 (Bonnez et al., 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347) y la construcción del baculovirus recombinante Ac11L1 (Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944). La secuencia genómica de HPV-11 se recuperó de una lesión de CIN III y se usaron métodos de clonación convencionales para construir el baculovirus Ac16L1 (Chesters y McCance, datos no publicados). La secuencia de L1 de HPV-18 se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa del prototipo de HPV-18 (proporcionado por H. zur Hausen) y se usó para construir el baculovirus Ac18L1 mediante el mismo procedimiento usado para la construcción de Ac11L1 (Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944).

50 EJEMPLO XI

Purificación de VLP recombinantes

Las VLP recombinantes se purificaron como describieron Rose et al., 1993, "Human papillomavirus type 11 (HPV-11) virus-like particles (VLPs) induce the formation of neutralizing antibodies and detect genital HPV-specific antibodies in human sera", en prensa. Las bandas únicas que contenían las VLP de HPV-11, HPV-16 o HPV-18 purificadas se retiraron de gradientes de densidad de CsCl mediante jeringa, se diluyeron con tampón A (solución salina tamponada con fosfato (PBS); MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF)) a 12 ml y se sedimentaron a 100.000 x g durante 90 minutos a 4°C. Los sedimentos se resuspendieron en 200 µl de tampón A que contenía el glicerol al 50%, cuantificado mediante espectrofotometría (280 nm) y se conservaron a -20°C. Las proteínas L1 recombinantes se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunoensayo de transferencia de Western como se ha

descrito previamente (Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944). Las muestras que contenían 5 µg de las VLP de HPV-11, -16 y -18 purificadas se sometieron a electroforesis, se transfirieron y se sondaron con un antisero de conejo anti-antígeno común de L1 de papilomavirus (anti-PVL1) como se ha descrito previamente (Strike et al., 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555; y Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944). Las capacidades de codificación predichas de las fases de lectura abierta (ORF) de L1 de HPV-11, -16 y -18 son 501 aminoácidos (Dartmann et al., 1986, Virology, vol. 151, págs. 124-130), 505 aminoácidos (Seedorf et al., 1985, Virology, vol. 145, págs. 181-185) y 507 aminoácidos (Cole et al., 1987, J. Mol. Biol., vol. 193, págs. 599-608), respectivamente y una banda inmunorreactiva de L1 del tamaño esperado (55 kD M_r) apareció en cada una de las tres preparaciones de muestra ensayadas mediante inmunoensayo de transferencia de Western (Fig. 15). También se detectaron proteínas inmunorreactivas de L1 de menor peso molecular mediante inmunoensayo de transferencia de Western de las preparaciones de VLP purificadas por CsCl (Fig. 15) y son probablemente productos de degradación de proteínas L1 de longitud completa, ya que las cantidades relativas de estas proteínas variaron en análisis posteriores (datos no mostrados). Sin embargo, las bandas inmunorreactivas de L1 principales ~ 55 kD de M_r en cada una de las muestras no variaron ni en sus movilidades ni en sus cantidades relativas (datos no mostrados). La microscopía electrónica de muestras purificadas (teñidas negativamente con ácido fosfotungstico al 2%) confirmó la formación de VLP en preparaciones de VLP de HPV-11 (Fig. 16A), HPV-16 (Fig. 16B) y HPV-18 (Fig. 16C).

EJEMPLO XII

Preparación de sueros inmunes de VLP de conejo y condiciones del ensayo ELISA

Se prepararon sueros inmunes de conejo de VLP de L1 de HPV-11, HPV-16 y HPV-18 inmunizando dos conejos blancos de Nueva Zelanda por vía intramuscular en dos sitios con cada una de las preparaciones de VLP (es decir, se inmunizaron seis conejos), usando los métodos descritos previamente (Bonnez et al., 1992, J. Infect. Dis., vol. 165, págs. 376-380; Rose et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 1936-1944). Los antisueros anti-antígeno común de PVL1 de conejo (Strike et al., 1989, J. Gen. Virol., vol. 70, págs. 543-555), virión completo HPV-11 (Bonnez et al., 1992, J. Infect. Dis., vol. 165, págs. 376-380) y VLP de HPV-11, -16, y -18 se ensayaron con ELISA frente a las tres preparaciones de VLP recombinantes (Fig. 17). Para este ELISA, se diluyeron las VLP purificadas hasta una concentración de 10 / µl en PBS y se dosificaron alícuotas que contenían aproximadamente 1 µg de antígeno o PBS en solitario en hileras alternas de placas de ELISA de 96 pocillos. Las condiciones del ensayo eran exactamente como se ha descrito previamente (Rose et al., 1993, "Human papillomavirus type 11 (HPV-11) virus-like particles (VLPs) induce the formation of neutralizing antibodies and detect genital HPV-specific antibodies in human sera", en prensa), excepto que los antisueros primarios se pre-absorbieron con un lisado de células Sf-9 infectadas por baculovirus (AcNPV) no recombinante diluido en solución de bloqueo (al 2% v/v) antes del ensayo. Todos los antisueros se ensayaron por duplicado, en numerosas ocasiones, a diluciones que variaban de 1:1.000 a 1: 128.000. Los valores de absorbancia para todos los antisueros anti-VLP de conejo mostrados en la Fig. 17 se obtuvieron a la dilución óptima para estos antisueros de 1:16.000. Los valores de absorbancia para los antisueros de conejo anti-antígeno común de PVL1 y virión completo de HPV-11 se obtuvieron a una menor dilución (1:1.000). Se determinaron los valores de absorbancia específica restando los valores de control (pocillos de PVS) de los valores experimentales (pocillos que contenían antígeno) para cada réplica y se determinaron los valores de absorbancia media (405 nm).

EJEMPLO XIII

Ensayo ELISA de VLP

Las VLP se ensayaron en un inmunoensayo de ELISA para evaluar su capacidad de detectar anticuerpos específicos en sueros de pacientes y los resultados se compararon con los resultados obtenidos previamente usando los mismos sueros en un inmunoensayo de ELISA de virión completo de HPV-11 (Bonnez et al., 1993, J. Med. Virol., vol. 39, 340-344). El antígeno se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para dar una cantidad equivalente a la cantidad usada en el ELISA de virión completo previo (Bonnez et al., 1993, J. Med. Virol., vol. 39, 340-344) y la solución de antígeno o PBS sin ningún antígeno se dividieron en alícuotas en hileras alternas de placas de 96 pocillos. Después del recubrimiento durante 16 horas a 4°C, estas soluciones se aspiraron y los pocillos se bloquearon con solución diluyente/de bloqueo (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) a temperatura ambiente durante 2 horas. Un total de 59 sueros humanos (43 pacientes, 16 controles) previamente ensayados con ELISA de partículas de virus completo de HPV-11 (Bonnez et al., 1993, J. Med. Virol., vol. 39, 340-344) se diluyeron en solución de diluyente/de bloqueo 1:100 y se añadieron alícuotas de 100 µl a los pocillos tratados con PBS en solitario o con solución de antígeno (dos réplicas por muestra de suero). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos y después se lavaron cuatro veces (solución de lavado, Kirkegaard y Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). Se añadió un conjugado de anti-IgG humana con fosfatasa alcalina (alícuotas de 100 µl, diluidas 1:5.000, TAGO, Burlingame, CA) a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces y se desarrollaron con sustrato de fosfatasa alcalina (fosfato de p-nitrofenilo en tampón de dietanolamina). La absorbancia específica a 405 nm para cada muestra de suero se calculó restando el valor obtenido del pocillo tratado con PBS del valor obtenido del pocillo que contiene antígeno para cada réplica y se calcularon las diferencias de réplicas medias. En el ELISA de virión completo analizado a lo largo de este documento, se analizaron 42 sueros de pacientes (y 20 sueros de control) para cambios en los niveles de anticuerpo de cápside durante el transcurso de tratamiento (Bonnez et al., 1993, J. Med. Virol., vol. 39, 340-344). Todos los sueros ensayados en el presente estudio de ELISA se recogieron en la entrada en el estudio previo. Uno de los sueros de los pacientes analizados en el estudio

previo se excluyó posteriormente por motivos relacionados con el resultado del tratamiento y no con los resultados del inmunoensayo. Sin embargo, debido a que el valor de la absorbancia de este suero estaba disponible, el suero se incluyó en el presente ensayo, lo que aumentó el número de los sueros de los pacientes analizados en el presente estudio de ELISA a 43. El número de sueros de control realizados se redujo de 20 a 16 por consideraciones logísticas relacionadas con el ensayo.

La serorreactividad media [intervalo] de los 16 sueros de control, expresada como un valor de DO, era 0,005 [-0,029, 0,025], en comparación con 0,024 [-0,063, 0,512] para los 43 sueros de pacientes, una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,01$; ensayo U de Mann-Whitney). Usando el mayor valor de DO en el grupo de control como un límite, la sensibilidad del ensayo era del 49% ($P = 2 \times 10^{-4}$; ensayo preciso de Fisher). Por lo tanto, el ELISA de VLP de HPV-11 estaba disponible para diferenciar entre los pacientes con condiloma acuminatum y los controles. Además, existía una correlación excelente (momento-producto de Pearson $r=0,87$; $P < 10^{-6}$) entre serorreactividades de muestra con el ensayo de ELISA de VLP de HPV-11 y el ELISA de virión de HPV-11 cuando se incluyeron todos los sueros o cuando se consideraron solamente los 21 sueros positivos por ELISA de VLP de HPV-11 ($r=0,87$; $P < 10^{-6}$).

15 RESULTADOS

Las observaciones inmunológicas sugieren que la L1 recombinante adopta una conformación nativa. El antisuero de conejo generado contra el antígeno común de L1 desnaturalizado era inmunorreactivo solamente con L1 recombinante desnaturalizada (es decir, mediante transferencia de Western) mientras que el antisuero de conejo sensibilizado contra partículas de virus completo no desnaturalizadas reaccionó solamente con L1 recombinante no desnaturalizada (es decir, por inmunotransferencia puntual). Además, los sueros humanos de pacientes con condiloma acuminatum que eran reactivos con viriones de HPV-11 en un ELISA de acuerdo con Bonnez et al., "Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata," 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347, también reaccionaron con L1 recombinante de HPV-11 no desnaturalizada (Figs. 4, 8 y 9). Por lo tanto, parece que los epítopos conformacionales de las VLP de la invención son similares a los presentes en los viriones de HPV-11 nativos, que el sistema inmune humano reconoce durante la infección natural. Varios estudios realizados de serología de papilomavirus demuestran que las especificidades de anticuerpo de epítopo conformacional son buenos indicadores de la infección por papilomavirus (Bonnez et al., "Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata," 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347; Bonnez et al., "Evolution of the antibody response to human papillomavirus type 11 (HPV-11) in patients with condyloma acuminatum according to treatment response," 1991, J. Med. Virol., 1991, en prensa; Bonnez et al., "Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction," 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380; Christensen et al., "Detection of human serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions," 1992, J. Gen. Virol., vol. 73, págs. 1261-1267; Kienzler et al., "Humoral and cell-mediated immunity to human papillomavirus type 1 (HPV-1) in human warts," 1983, Br. J. Dermatol., vol. 108, págs. 665-672; y Steele et al., "Humoral assays of human sera to disrupted and nondisrupted epitopes of human papillomavirus type 1," 1990, Virology, vol. 174, págs. 388-398). Estas especificidades también pueden desempeñar un papel significativo en la patogenia viral. Por ejemplo, un antisuero de conejo dirigido contra partículas de HPV-11 completas neutraliza la infectividad de HPV-11 (Bonnez et al., "Antibody-mediated neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) infection in the nude mouse: Detection of HPV-11 mRNAs by the polymerase chain reaction," 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380; y Christensen et al., "Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomavirus," 1990, J. Virol., vol. 64, págs. 3151-3156). Además, Christensen et al., "Detection of human serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions," 1992, J. Gen. Virol., vol. 73, págs. 1261-1267, usando sueros humanos, describieron una correlación entre el anticuerpo anti-virión de HPV-11 completo y la actividad neutralizante del suero. La detección de tales anticuerpos con las VLP de L1 recombinantes de la presente invención puede tener trascendencia de diagnóstico y funcional.

Cuando se tiene en cuenta la construcción del baculovirus recombinante, algunos de los baculovirus recombinantes anteriores que los solicitantes construyeron tenían la secuencia codificante de L1 correcta, pero no producían niveles detectables de proteínas L1. Esto provocó que los solicitantes consideraran las regiones no traducidas 3' de las secuencias codificantes de L1 de HPV-11 y varios otros HPV. Se determinó que una secuencia señal de degradación de ARNm pentanucleotídica, AUUUA, (Shaw G. y Kamen R., "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation," Cell, 1986, vol. 46, págs. 659-67; Cole MD. and Mango SE., "cis-acting determinants of c-myc mRNA stability," 1990, Enzyme, vol. 44, págs. 167-80; Shyu AB et al., "Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay," Genes & Development, 1991, vol. 5, págs. 221-31; Savant-Bhonsale S. y Cleveland DW., "Evidence for instability of mRNAs containing AUUUA motifs mediated through translation-dependent assembly of a 20S degradation complex," Genes & Development, 1992, vol. 6, págs. 1927-37) estaba dentro de 30 nucleótidos del codón de terminación de la secuencia codificante de L1 de HPV-11 y, además, los otros tipos de HPV considerados también tenían la secuencia AUUUA cerca del codón de terminación de L1. Si esta secuencia se eliminaba, o se introducía una mutación, se podría aumentar el nivel de expresión de la proteína L1. Por lo tanto, también se diseñaron cebadores de PCR para amplificar la secuencia codificante de L1 de ADN genómico de HPV-11 que no incorporaban solamente sitios de enzimas de restricción para la clonación, sino también mutaban la secuencia pentanucleotídica AUUUA 30 nucleótidos cadena abajo del codón de terminación de L1. El cambio de escala de este clon produjo niveles extremadamente altos de la proteína L1. Los informes usando el sistema BEVS han proporcionado niveles de

producción de proteína recombinante en el intervalo de 300-500 mg/litro de cultivo celular. En la presente invención, los niveles para la producción de proteína L1 recombinante eran mucho mayores, de aproximadamente 600-800 mg/litro, posiblemente debido a la retirada de la secuencia señal de degradación de L1 en la región no traducida 3'.

5 Estos resultados muestran que, en condiciones experimentales similares, los sueros post-inmunes de conejos inmunizados con las VLP de HPV-11 pueden bloquear la infección por HPV-11 de tejido humano de forma tan eficaz como los sueros obtenidos de conejos inmunizados con viriones completos de HPV-11. El bloqueo, que no se observó con los respectivos sueros pre-inmunes, se asoció a la ausencia de la expresión de gen viral temprano. Por lo tanto, el efecto concordaba con la neutralización viral clásica, es decir, la prevención de la penetración o decapsidación del virus (Dimmock, 1993, Neutralization of Animal Viruses, Berlin: Springer-Verlag).

10 Para proporcionar la confirmación de la neutralización de HPV-11 por análisis de expresión del gen viral, todos los injertos se analizaron para la presencia del transcripto de ARNm escindido E1^E4 de HPV-11 (datos no mostrados), como describieron previamente Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380. El ARNm E1^E4 se detectó en 10/12 (83%) y 0/12 (0%) de los injertos de los grupos pre-tratados con sueros de VLP pre- o post-inmunes, respectivamente ($p < 10^{-1}$). De forma similar, en los grupos de control pre-tratados con sueros anti-virión completo pre- o post-inmunes se detectó ARNm E1^E4 en 8/11 (73%) y 0/11 (0%) injertos, respectivamente ($p = 10^{-3}$). Estos resultados indican que el tratamiento del inóculo viral con el suero de VLP post-inmune se asocia a hibridación marcada de crecimiento del injerto y expresión del gen viral, efectos que concuerdan con la neutralización inmune. Por tanto, las VLP recombinantes pueden inducir una respuesta de neutralización similar en magnitud a la respuesta obtenida por inmunización con virus infeccioso.

15 20 Las VLP de L1-L2 de HPV-16 descritas por Zhou et al., 1991, Virology, vol. 185, págs. 251-257 eran variables en tamaño y menores (35-40 nm de diámetro) que los viriones de HPV (50-55) o las VLP de HPV-11 producidas en baculovirus (50-55 nm; Rose et al., en prensa, 1993). Estas características morfológicas son bastante diferentes de las de las VLP descritas en la presente invención. Además, usando el método de la invención, la proteína L1 de HPV en solitario es suficiente para la formación de partículas cuyas características biofísicas y propiedades antigenéticas reflejan estrechamente las de los viriones de HPV nativos.

25 30 Usando una estrategia similar, Kirnbauer, et al. describieron la inhibición de la transformación mediada por BPV-1 de células C127 de ratón *in vitro* mediante anticuerpos anti-VLP de BPV-1 (Kirnbauer et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, págs. 12180-12184). Los resultados obtenidos en este sistema respaldan los resultados descritos en la presente invención, en la que los solicitantes han demostrado la neutralización usando un HPV genital y su tejido diana normal. Aunque se ha notificado la concordancia de los resultados del ensayo de células C127/BPV-1 y el sistema de xenoinjerto de piel fetal bovina en ratón atílico, como describieron previamente Ghim et al., 1993, Int. J. Cancer, vol. 49, págs. 285-289, el sistema de fibroblasto de ratón BPV-1/C127 no es productivo y, por lo tanto, la neutralización se puede inferir solamente a partir de la ausencia de focos transformados *in vitro*. Además, el BPV-1 no infecta de forma natural a los ratones y el mecanismo por el que obtiene la entrada en las células C127 puede diferir del mecanismo implicado en el proceso de infección natural. Por el contrario, el modelo de ratón atílico usado en el presente estudio depende de la infección por un HPV genital de su tejido diana natural como describieron previamente Kreider et al., 1985, Nature, vol. 317, págs. 639-641, el injerto infectado se mantiene *in vivo* y la transformación morfológica e histológica del injerto infectado está acompañada por la producción de viriones infecciosos. (Véase Kreider et al., 1987, J. Virol., vol. 61, págs. 590-593). La inhibición del crecimiento del injerto mediada por anticuerpo, como describieron previamente Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380; Christensen et al., 1990, J. Virol., vol. 64, págs. 3151-3156; Christensen et al., 1991, Virus Research, vol. 21, págs. 169-179; Christensen et al., 1990, J. Virol., vol. 64, págs. 5678-5681; y Christensen et al., 1992, J. Gen. Virol., vol. 73, págs. 1261-1267 y las pruebas inmunocitoquímicas y de biología molecular de la inhibición de la expresión del gen viral se ha documentado bien, como describen previamente Bonnez et al., 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347; y Bonnez et al., 1992, J. Inf. Dis., vol. 165, págs. 376-380. Por lo tanto, las observaciones realizadas en el sistema de ratón atílico pueden reflejar de forma más precisa los acontecimientos que tienen lugar en la infección natural.

40 45 50 Los anticuerpos neutralizantes para HPV-11 se han identificado en seres humanos con condiloma acuminatum como describieron previamente Christensen et al., 1992, J. Gen. Virol., vol. 73, págs. 1261-1267, pero su significado biológico se desconoce. Si se demuestra que la neutralización es un mecanismo efector inmunológico protector contra infecciones por papilomavirus *in vivo*, entonces la inmunización con las VLP recombinantes puede proporcionar inmunidad protectora a individuos en riesgo de infección. Los resultados de los solicitantes sugieren que la magnitud de la actividad de la neutralización de anticuerpos de VLP de HPV-11 es similar a la de anticuerpos específicos para viriones infecciosos de HPV-11. Por lo tanto, parece que las VLP son buenas candidatas para vacunas. Sin embargo, el grado de reactividad cruzada de los determinantes conformacionales de la cápside entre diferentes tipos de HPV todavía no se conoce y puede ser bajo como describen previamente Gissmann et al., 1977, Virology, vol. 76, págs. 569-580; Gross et al., 1983, Oncogenic Viruses, Pergamon Press, New York; Hagensee et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 315-322; Howley et al., "Papillomavirinae and their replication", Cap. 58, pág. 1625-1650, in B. N. Fields and D.M. Knipe (ed.), Virology, 2^a ed., Vol. 2. Raven Press, New York (1990); Kirnbauer et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, págs. 12180-12184; Kreider et al., 1987, J. Virol., vol. 61, págs. 590-593; Kreider et al., 1985, Nature, vol. 317, págs. 639-641; y Orth et al., 1977, J. Virol., vol. 24, págs. 108-120. La caracterización completa del potencial de las VLP recombinantes para su uso como inmunógenos para la prevención de enfermedad por HPV genital requerirá estudios

adicionales que impliquen las VLP obtenidas de otros tipos de HPV genital. Será de importancia particular determinar si los anticuerpos para las VLP de HPV genitales heterólogos serán capaces de neutralizar la infección por HPV.

Con referencia a la Figura 17, los antisueros de partículas de virus completo de HPV-11 (B) y de VLP de HPV-11 (C, D) reaccionaron fuertemente con las VLP de HPV-11, pero ninguno de estos antisueros reaccionó con las preparaciones de VLP de HPV-16 o HPV-18. De forma similar, los antisueros de conejo de VLP de L1 de HPV-16 (E, F) y HPV-18 (G, H) reaccionaron solamente con las VLP homotípicas. Las especificidades de estas reacciones se verificaron en experimentos de pre-absorción, en los que la inmunorreactividad de cada antisuero de VLP de conejo se anuló mediante pre-absorción con las VLP homotípicas, pero no con las heterotípicas (datos no mostrados). Ninguno de los sueros pre-inmunes de conejo reaccionó con ninguna de las preparaciones de VLP (datos no mostrados). El antisuero anti-antígeno común de PVL1, que reaccionó bien con proteínas L1 recombinantes mediante inmunotransferencia de Western (Fig. 15), reaccionó sólo ligeramente con las preparaciones de VLP nativas en el ELISA (Fig. 17A). Esta observación sugiere que los epítopos que este antisuero reconoce normalmente están enmascarados en las condiciones del ensayo ELISA y que las proteínas L1 ensayadas en este ensayo están predominantemente no desnaturalizadas.

La presente invención ha demostrado que los epítopos de VLP de L1 de HPV-11, -16 y -18 son antigenicamente distintos. Aunque las proteínas de cápside L2 no estaban presentes en estas preparaciones de VLP, es probable que la diferencia antigenica observada entre los tipos de HPV también se aplique a viriones. La L2 representa aproximadamente el 10% del contenido de proteína total de las partículas de HPV (Doorbar et al., 1987, J. Virol., vol. 61, 2793-2799) y, aunque su localización exacta en la partícula no se ha determinado (Baker et al., 1991, Biophysical J., vol. 60, págs. 1445-1456), estudios recientes han sugerido que esto puede ser necesario para la encapsidación del ADN (Zhou et al., 1993, J. Gen. Virol., vol. 74, págs. 763-768) y que un dominio presente en la parte amino terminal relativamente conservada de la secuencia de aminoácidos de L2 de HPV-16 media en la unión de ADN no específica (Zhou et al., 1994, J. Virol., vol. 68, págs. 619-625). Aunque el resto de la secuencia de aminoácidos de L2 es muy heterogénea entre papilomavirus (Danos et al., 1990, J. Invest. Dermatology, vol. 83, págs. 7-11), no está claro si los anticuerpos específicos de L2 reaccionan con viriones intactos (Komly et al., 1986, J. Virol., vol. 60, págs. 813-816; y Hagansee et al., 1993, J. Virol., vol. 67, págs. 313-322). Por tanto, no se espera que la proteína L2 modifique sustancialmente los resultados del presente estudio.

Estudios previos han indicado que, usando técnicas serológicas, se pueden distinguir diferentes tipos de HPV entre sí. Por ejemplo, anticuerpos reactivos con viriones de verruga plantar se hallaron mucho más comúnmente en sueros de pacientes con verrugas plantares que en sueros de pacientes con verrugas comunes, planas, anogenitales o laríngeas (Pfister y zur Hausen, 1978, Int. J. Cancer, vol. 21, págs. 161-165; Kienzler et al., 1983, Brit. J. Dermatology, vol. 108, págs. 665-672; y Viac et al., 1990, J. Med. Virol., vol. 32, págs. 18-21). Anisimova et al., 1990, también demostraron directamente mediante microscopía inmuno-electrónica que el HPV-1 y HPV-2 son antigenicamente distintos. Sin embargo, también parece que los otros tipos de HPV están antigenicamente relacionados. Por ejemplo, la detección de anticuerpos que reconocen específicamente viriones de HPV-11 en sueros de pacientes con infección por HPV-6 documentada se describió previamente (Bonnez et al., 1991, J. Gen. Virol., vol. 72, págs. 1343-1347; y Bonnez et al., 1992, Virol., vol. 188, págs. 384-387). Debido a la ausencia de viriones de HPV disponibles de la mayoría de los tipos de HPV, las VLP son actualmente la mejor herramienta disponible para explorar la conexión antigenica entre los HPV. Las diferencias antigenicas entre los tipos de HPV probablemente refleja la diversidad genética en la secuencia codificante de L1. Chan et al., construyeron un árbol filogenético de papilomavirus que se basa en la divergencia genética dentro de una región definida de la secuencia de aminoácidos de L1 de papilomavirus (Chan et al., 1992, J. Virol., vol. 66, págs. 5714-5725). Su trabajo demuestra la relación evolutiva relativamente estrecha entre HPV-6 y HPV-11, que es coherente con la posible reactividad cruzada entre las cápsides de HPV-6 y -11. Por otro lado, se espera que el HPV-16 y HPV-18, que han divergido ampliamente en sus secuencias de L1, tengan poca reactividad cruzada antigenica entre sí o con el HPV-11. Estas predicciones son coherentes con los resultados de la presente invención.

Se desconoce la importancia biológica de la variabilidad antigenica de la cápside del HPV, pero la diversidad de la proteína de cápside podría explicar la especificidad tisular de papilomavirus. La disponibilidad de las VLP recombinantes de una diversidad de papilomavirus puede resultar útil en la identificación de supuestos receptores celulares específicos de hospedador y de tejido. Además, las VLP deben desempeñar un papel importante en la definición de las características antigenicas de las HPV y en la realización de estudios de respuestas inmunes para estos virus.

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de tipo virus o capsómero de papiloma humano, recombinante purificada, que comprende una proteína de cápside L1 de virus de papiloma humano de tipo genital expresada de una secuencia codificante de proteína L1 que produce una proteína o un complejo proteico que posee características inmunológicas y morfológicas similares a las del papilomavirus nativo, en el que dicha partícula o capsómero es capaz de reconocer anticuerpos en sueros humanos de personas que se sabe que están infectadas por un virus homólogo y en el que el papilomavirus humano es uno cualquiera de HPV-18, HPV-31, HPV-33 y HPV-35.
- 5 2. Una partícula de tipo virus de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un diámetro coherente con el diámetro de los viriones del papilomavirus aislado.
- 10 3. Una partícula de tipo virus o capsómero, de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dicha secuencia codificante de proteína L1 se expresa en una célula usando un sistema de expresión de baculovirus.
- 15 4. Una partícula de tipo virus o capsómero de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el papilomavirus humano es HPV-18.
5. Una partícula de tipo virus o capsómero de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el papilomavirus humano es HPV-31.
6. Una partícula de tipo virus o capsómero de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el papilomavirus humano es HPV-33.
7. Una partícula de tipo virus o capsómero de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el papilomavirus humano es HPV-35.
- 20 8. Una partícula de tipo virus o capsómero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que consiste en una proteína de cápside L1.
9. Una partícula de tipo virus o capsómero de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como una vacuna.
- 25 10. Una vacuna que comprende una partícula de tipo virus o capsómero de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
11. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 10 que es una vacuna polivalente que comprende una partícula de tipo virus de diferentes papilomavirus humanos.
12. Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11 que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 30 13. El uso de una partícula de tipo virus o capsómero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de una vacuna para otorgar inmunidad protectora contra papilomavirus humano o, si el paciente ya está infectado, para reforzar la propia respuesta inmune del paciente.
- 35 14. Un método *in vitro* de producción de una partícula de tipo virus o capsómero de papiloma humano de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el método transfectar una célula con un vector de expresión recombinante que contiene una secuencia codificante de proteína de cápside L1 de HPV de tipo genital en condiciones que facilite la expresión de dicha proteína de cápside, produciendo de este modo dichas partículas de tipo virus o capsómeros.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el vector de expresión recombinante es un sistema de expresión de baculovirus.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la célula es una célula de insecto.
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicha transfección se realiza por infección.
- 40 18. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, comprendiendo el método:
- clonar la secuencia codificante de proteína de cápside L1 de HPV de tipo genital en un vector de transferencia de baculovirus;
- co-transfectar células de insecto con dicho vector de transferencia de baculovirus y ADN genómico de virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*;
- 45 recuperar los baculovirus recombinantes; e
- infectar células de insecto con dicho baculovirus recombinante en condiciones que faciliten la expresión de dicha proteína, produciendo de este modo las partículas de tipo virus.

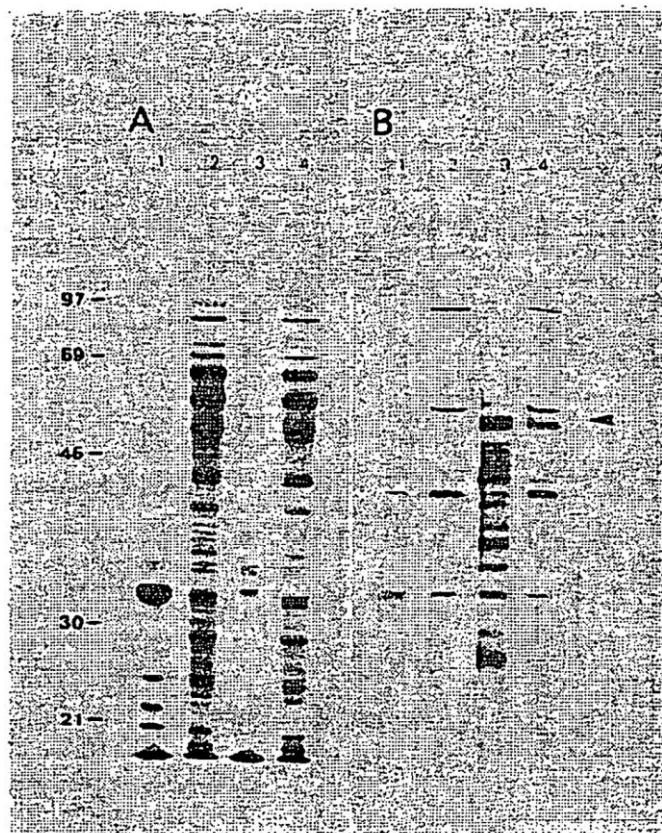


FIG. 1A

FIG. 1B

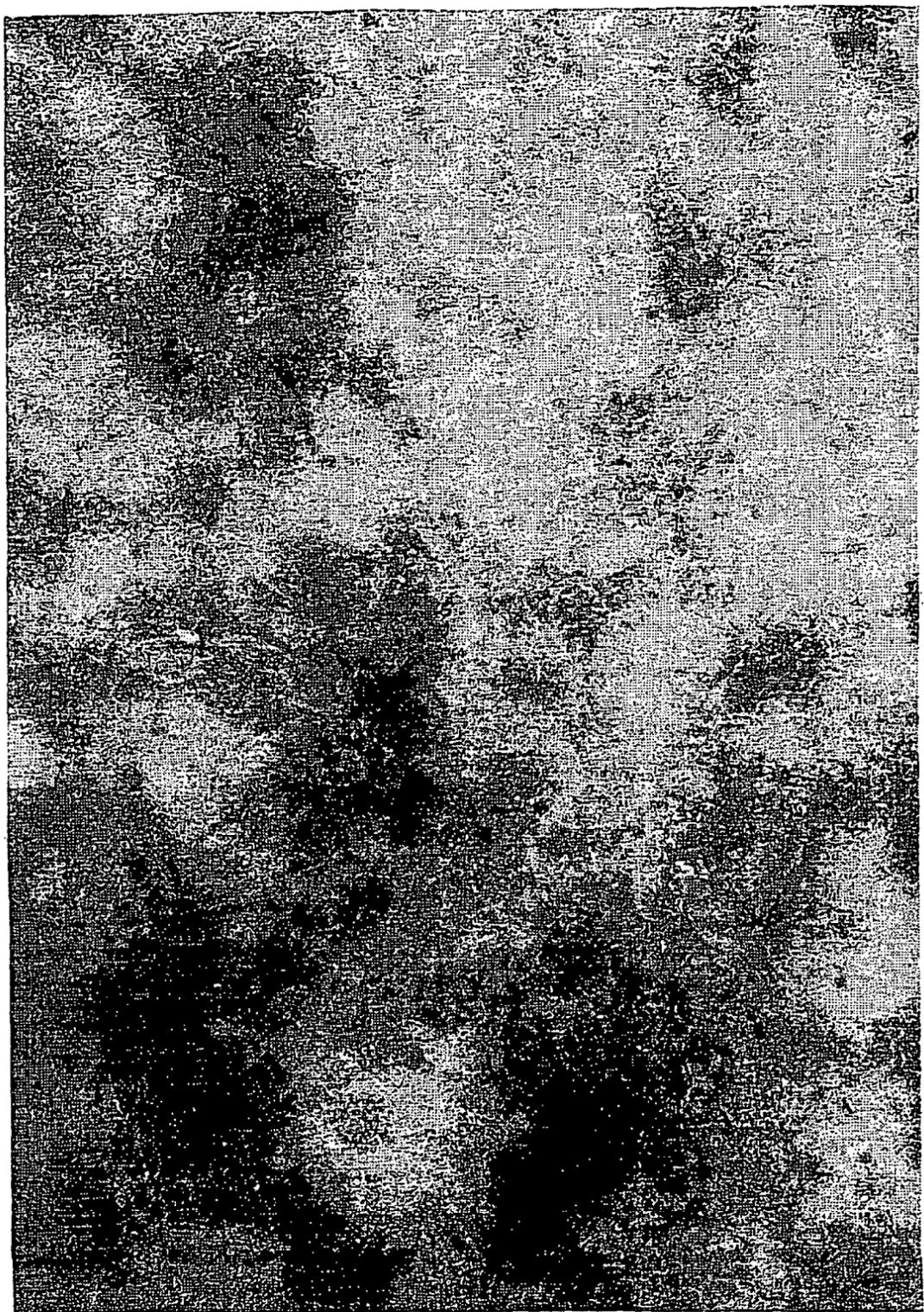


FIG. 2

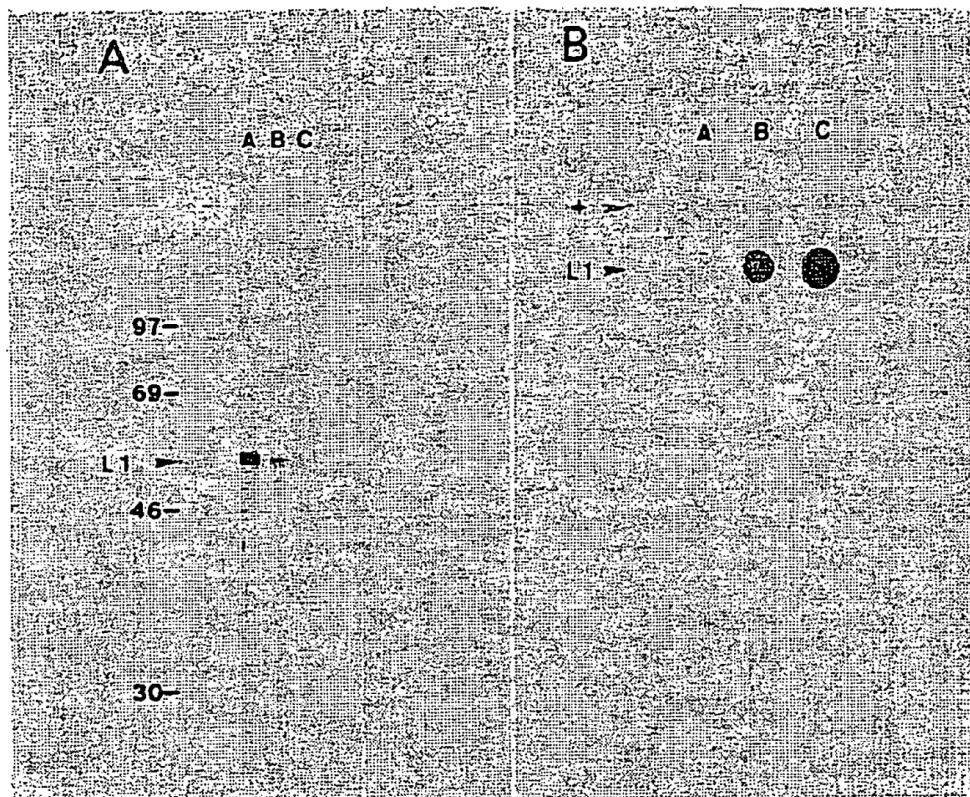


FIG. 3A

FIG. 3B

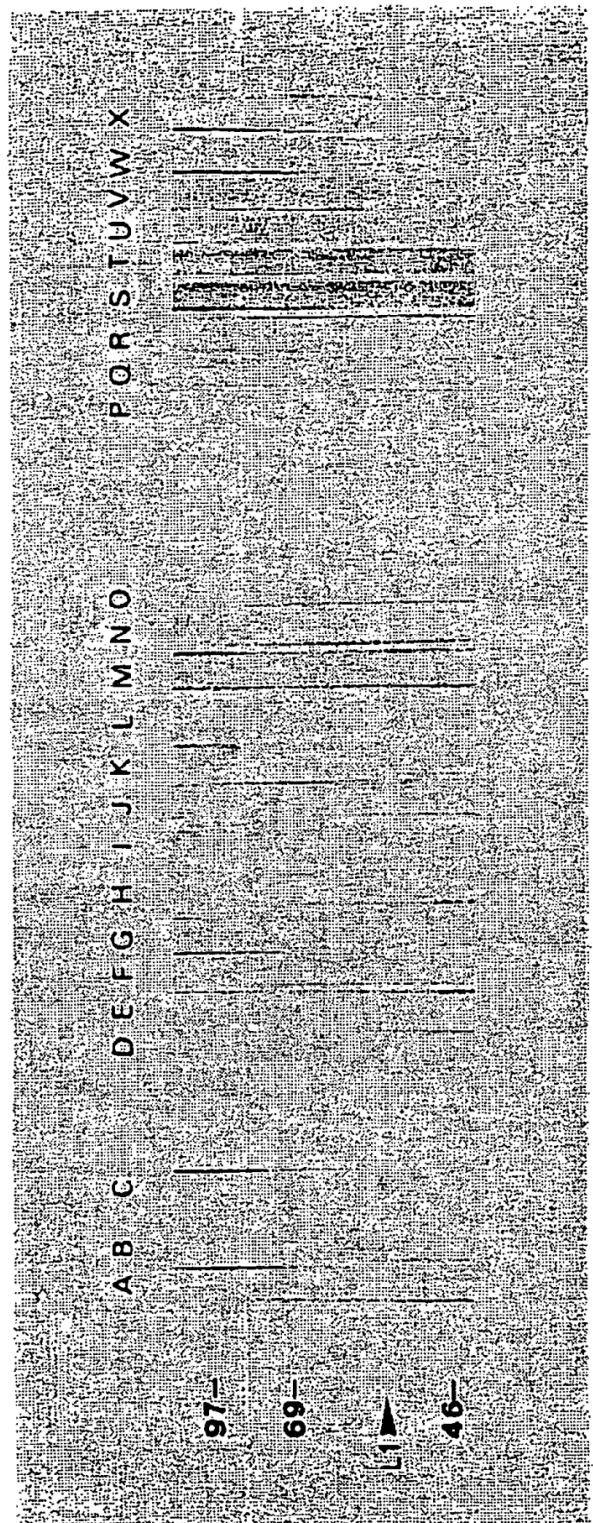


FIG. 4

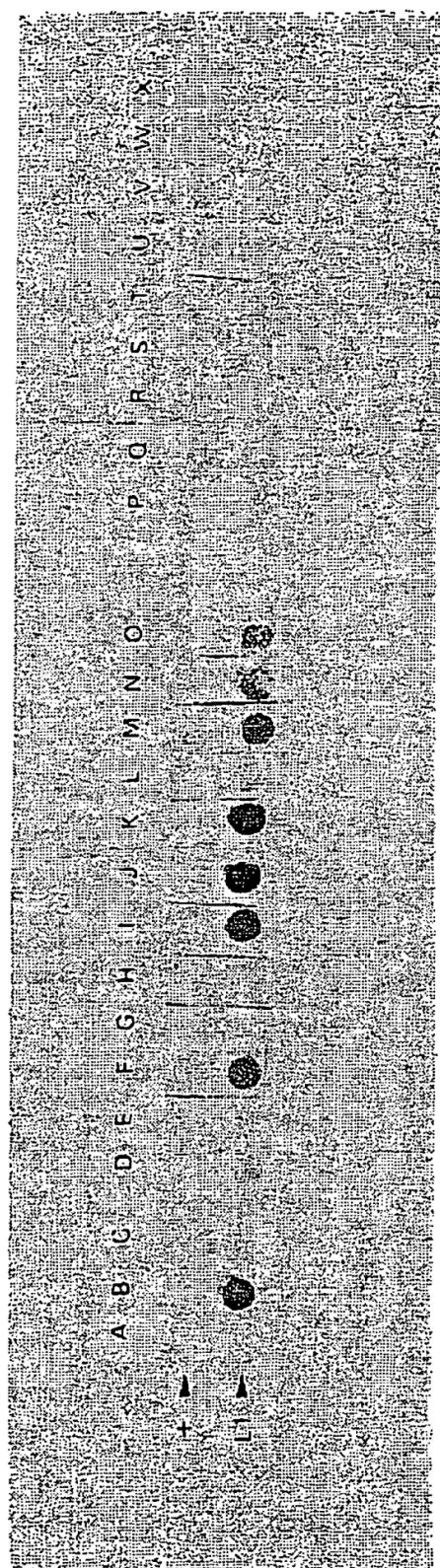


FIG. 5



FIG.6



FIG.7

SERORREACTIVIDAD DE PACIENTES CON CONDILOMA ACUMINATUM
A LAS VLP DE L1 DE HPV-11

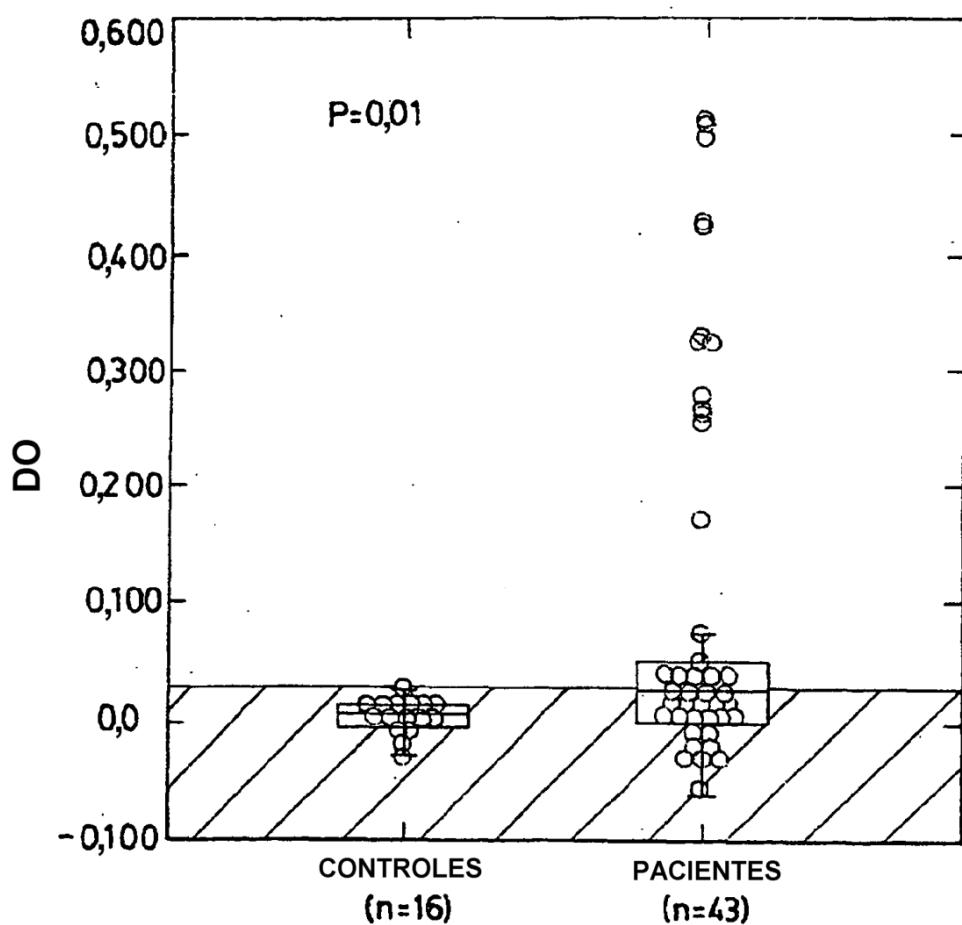


FIG.8

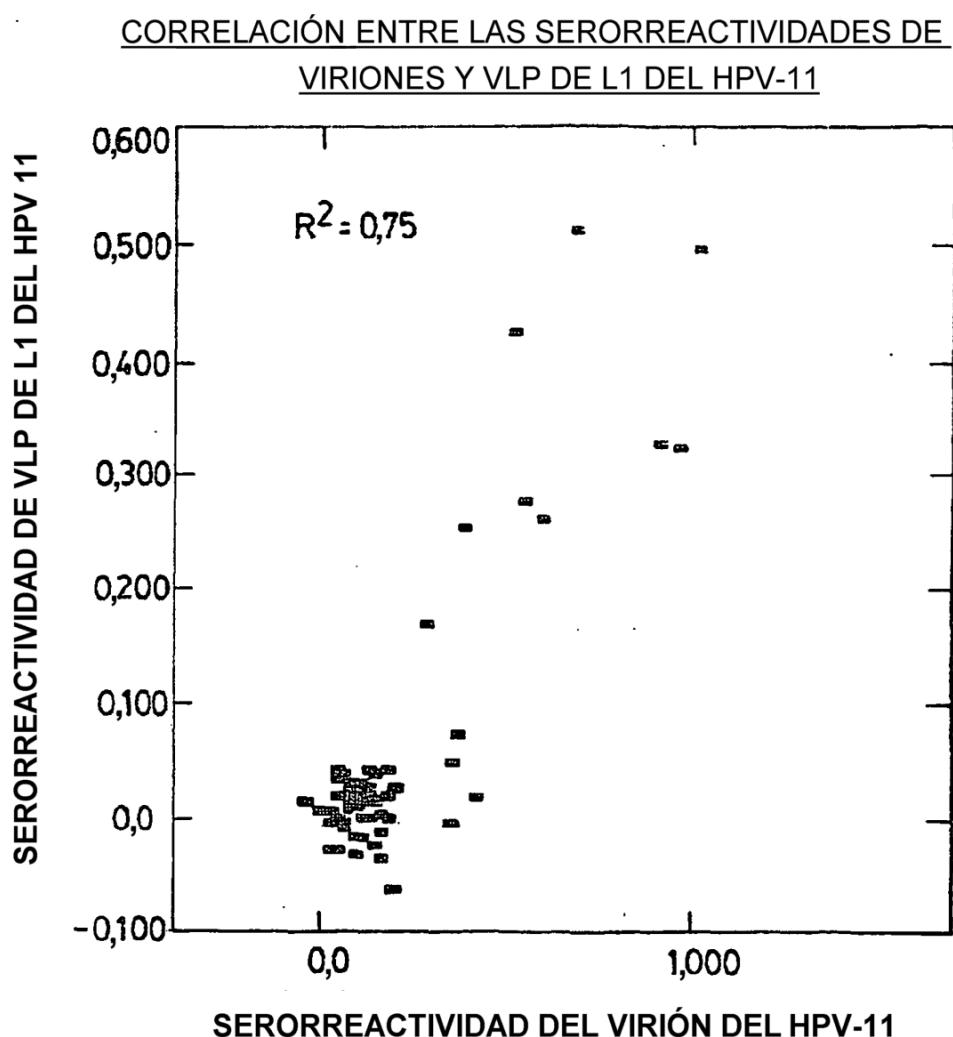


FIG.9

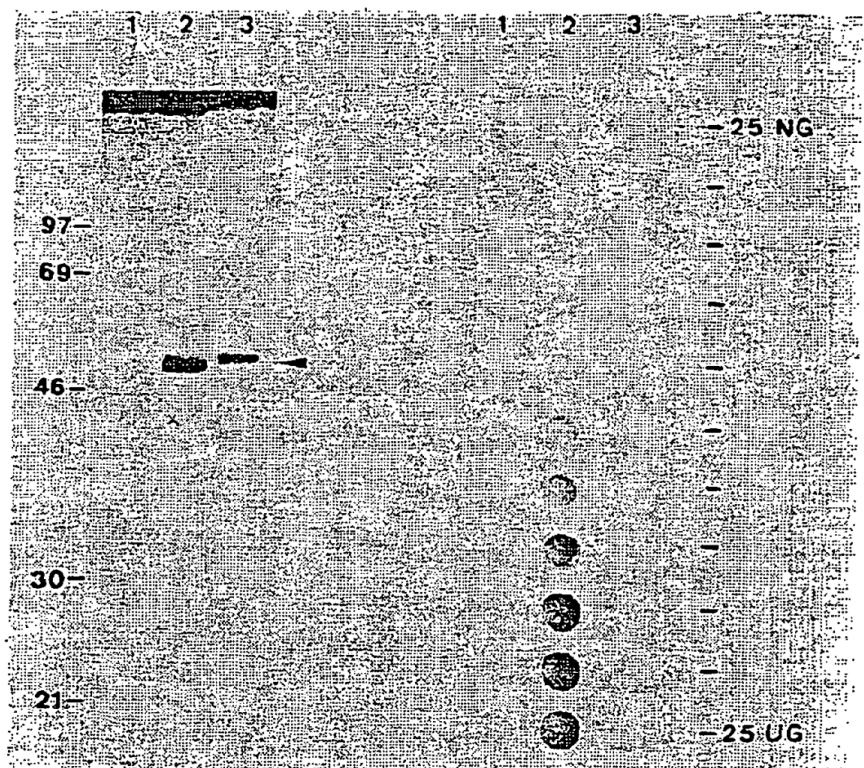


FIG.10

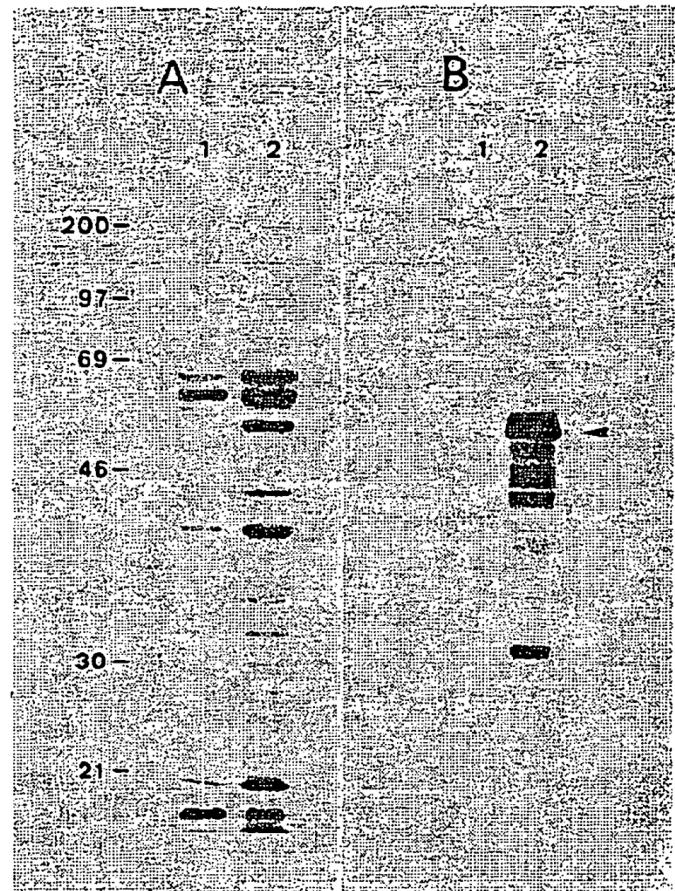


FIG.11A

FIG.11B

FIG.12A

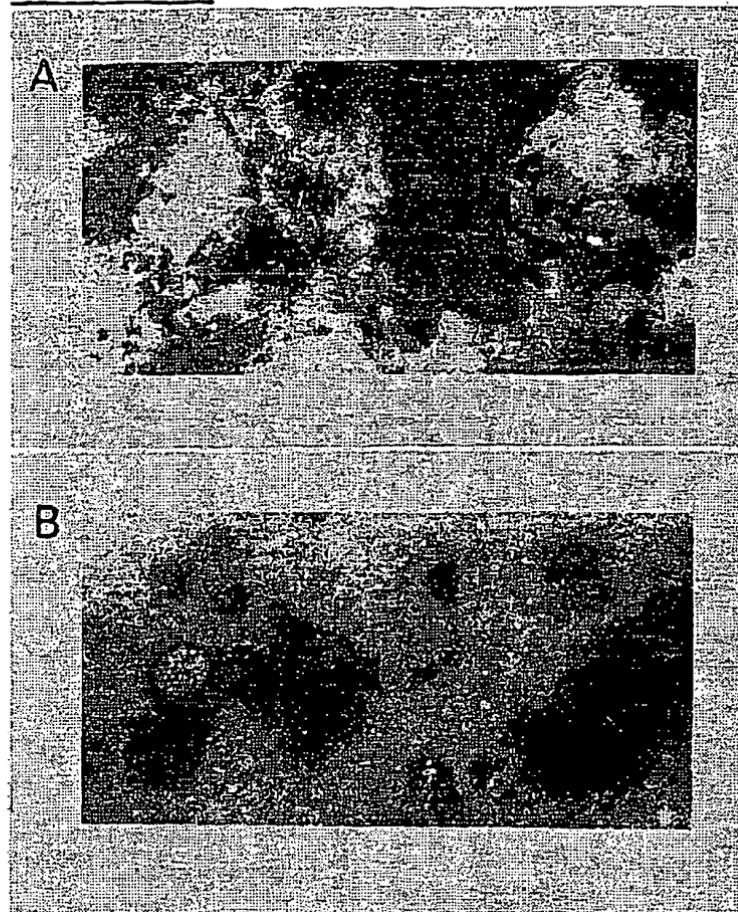


FIG.12B

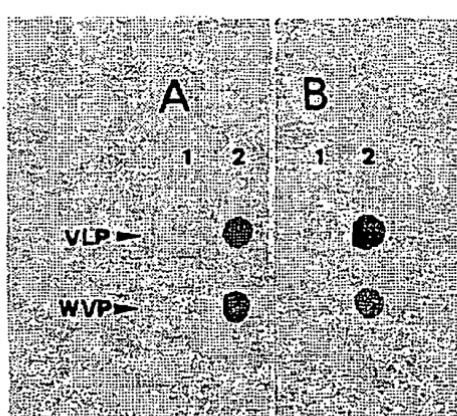


FIG.13A

FIG.13B

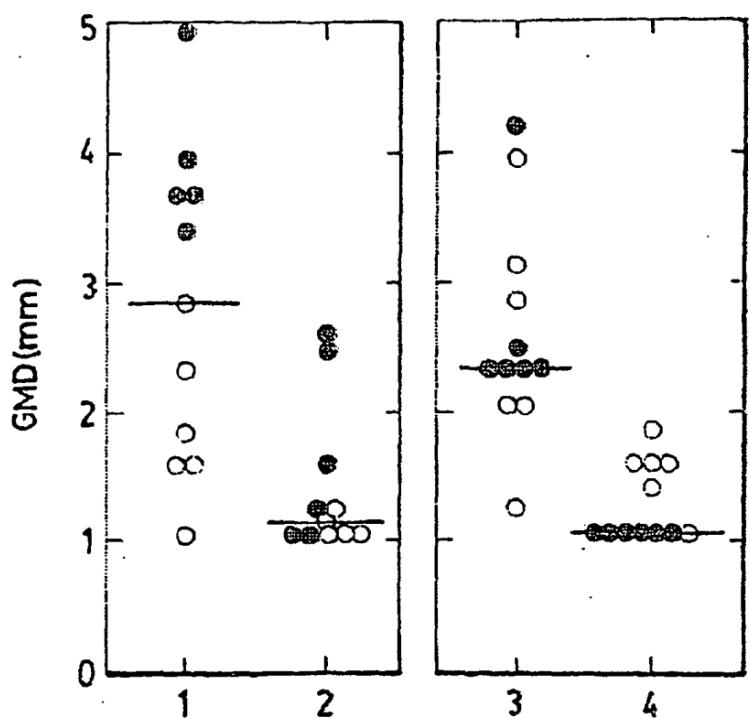


FIG 14

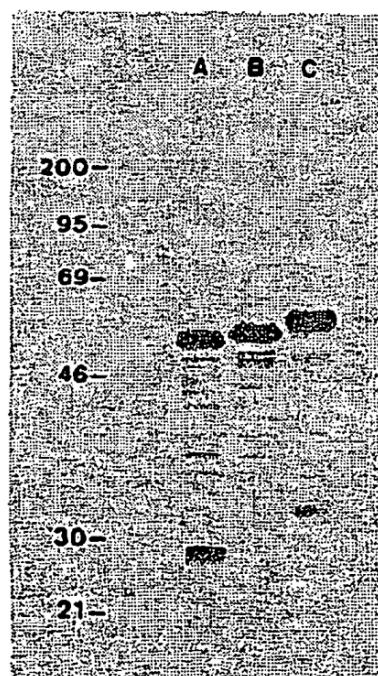


FIG.15

A



FIG. 16A

B

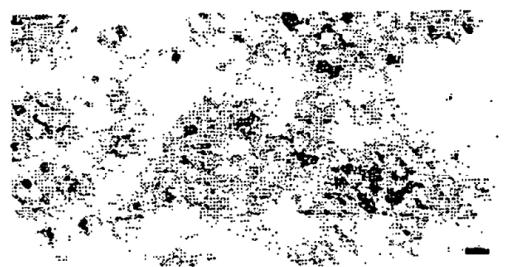


FIG. 16B

C

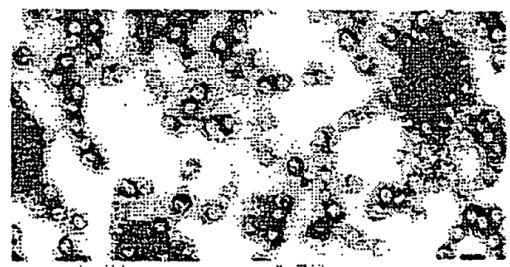


FIG. 16C

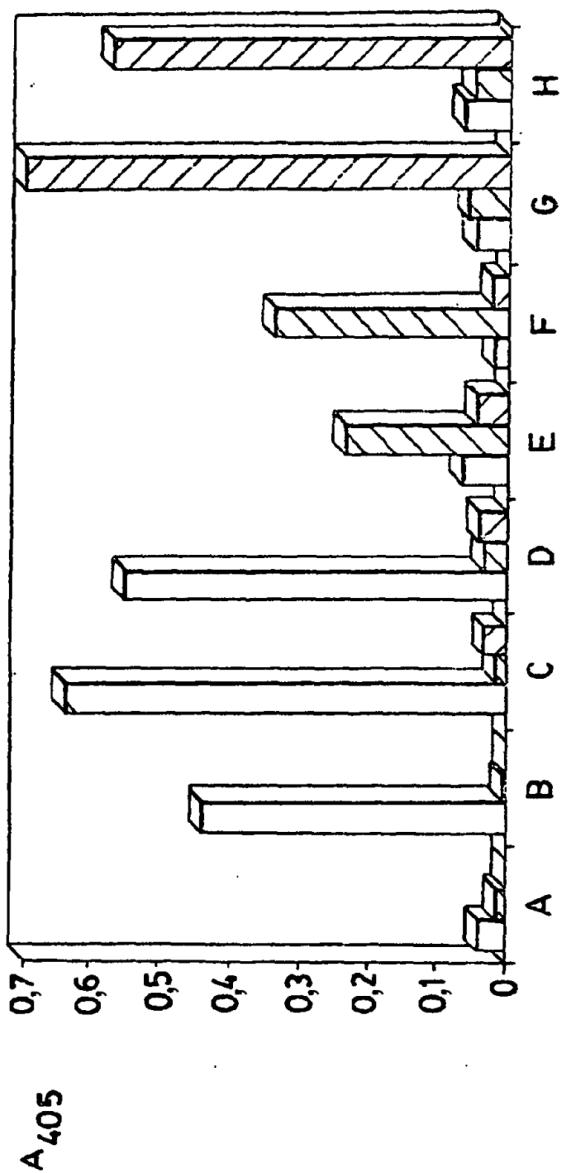


FIG.17