(11) Número de Publicação: **PT 647140 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/37 (2007.10) ***C12N 15/85*** (2007.10)
A61K 39/12 (2007.10) ***A61K 39/42*** (2007.10)
C12P 21/02 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1993.06.24**

(30) Prioridade(s): **1992.06.25 US 903109**

(43) Data de publicação do pedido: **1995.04.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.12.12**
151/2007

(73) Titular(es):
GEORGETOWN UNIVERSITY
37TH AND "O" STREETS N.W. WASHINGTON, D.C. 20057 **US**

(72) Inventor(es):
C. RICHARD SCHLEGEL **US**
A. BENNETT JENSON **US**
GHIM SHIN-JE **US**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **VACINAS DE PAPILOMAVÍRUS**

(57) Resumo:
VACINAS DE PAPILOMAVÍRUS

RESUMO

"Vacinas de papilomavírus"

Proporciona-se proteína da cápside principal L1 produzida recombinantemente que imita epítopos neutralizantes conformacionais presentes em viriões de papiloma humano e animal. As proteínas recombinantes são úteis como vacinas protectoras contra a infecção por papilomavírus. São também proporcionados anticorpos contra a proteína recombinante. Estes anticorpos são úteis no diagnóstico e no tratamento de infecção viral.

DESCRIÇÃO

"Vacinas de papilomavírus"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao diagnóstico, serotipagem, prevenção e tratamento de doenças virais, particularmente infecções por papilomavírus.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os papilomavírus (PV) são membros da família dos papovavírus e contêm um genoma de ADN circular de cadeia dupla com uma dimensão típica de cerca de 7900 pares de bases (pb). Os papilomavírus humanos (HPV) são reconhecidos como uma causa de várias lesões epiteliais tais como verrugas, condilomas e displasias. Veja-se, Gissman, L. Cancer Survey 3:161 (1984); Boshart *et al.*, EMBO J. 3: 1151 (1984); Romanczuk *et al*, J. Virol. 65:2739-2744 (1991); Jenson *et al*, em "Papillomaviruses and human cancer" (H. Pfister. Ed.), pp. 11-43, CRC Press (1990); Schlegel, R., "Papillomaviruses and human cancer" em: Viral pathogenesis (ed. Fujinami, R.), Seminars in Virology 1:297-306 (1990); e Jenson *et al*, "Human Papillomaviruses" em Belshe, R. ed. Textbook of human virology, Second Edition: MASS:PSG, 1989:951.

Os HPV estão agrupados em tipos com base na similaridade das suas sequências de ADN. Dois HPV são taxonomicamente classificados como sendo do mesmo tipo se os seus ADN hibridarem de modo cruzado em mais de 50%, medido por hibridação em solução sob condições de hibridação de rigor moderado.

Mostrou-se que vários papilomavírus distintos infectam seres humanos. Os papilomavírus são altamente específicos da espécie e do tecido, e são caracterizados por um modo específico de interacção com os epitélios escamosos que infectam. Estes pequenos vírus tumorais de ADN colonizam vários epitélios estratificados como a pele e as mucosas oral e genital, e induzem a formação de tumores benignos auto-limitantes conhecidos como papilomas (verrugas) ou condilomas.

Crê-se que estes tumores surgem a partir de um evento inicial no ciclo infeccioso onde o vírus aumenta a taxa de divisão da célula estaminal infectada na camada epitelial basal, antes de se replicar no queratinócito em diferenciação.

O termo papilomavírus cobre um grande número de vírus que são considerados responsáveis por diversas formas de infecção viral variando desde verrugas relativamente benignas da pele ou das membranas mucosas até hiperplasias susceptíveis de progressão em displasias ou neoplasmas intra-epiteliais, e conversão maligna em várias formas de cancro, sendo a mais significativa a do colo uterino das fêmeas.

Foram identificados vários tipos de HPV. Adicionalmente, a associação preferencial de certos tipos de HPV com a localização anatómica e tipos distintos de lesões dá suporte à hipótese de que lesões induzidas por HPV diferentes constituem doenças distintas, e que os padrões clínicos de lesões expressam propriedades biológicas específicas de tipos distintos de HPV. Características histológicas distintas foram associadas com a infecção da pele ou de membranas mucosas por diferentes tipos de HPV.

Foram clonados e caracterizados os genomas de diferentes tipos de HPV. Em particular, verificou-se que os genomas de dois tipos de HPV, o HPV 16 e o HPV 18, estão associados a cerca de 70% dos carcinomas invasivos do colo uterino.

Os papilomavírus humanos que infectam a mucosa do tracto genital desempenham um papel crítico no desenvolvimento do cancro cervical. Veja-se, Lorincz *et al*, Obstetrics & Gynecology, 79:328-337 (1992); Beaudenon *et al*, Nature, 321:246-249 (1986); e Holloway *et al*, Gynecol. Onc., 41:123-128 (1991). Por exemplo, a maioria dos carcinomas cervicais humanos (95%) contém e expressa ADN de HPV e é a expressão de duas oncoproteínas virais, a E6 e a E7, que parecem ser críticas para a transformação celular e a manutenção do estado transformado. Apesar do conhecimento detalhado relativamente ao mecanismo molecular de acção destas oncoproteínas, existe pouca informação disponível sobre a biologia da infecção por papilomavírus, incluindo a identidade de receptores virais, o controlo da replicação e montagem virais, e a resposta

imunitária do hospedeiro ao vírus e às células transformadas com o vírus. Uma vacina eficaz contra a infecção por HPV iria potencialmente reduzir a incidência de displasia e carcinoma cervicais humanos em 90-95%. Contudo, não existem sistemas de cultura de tecidos que permitam uma diferenciação de queratinócitos suficiente para propagar o PV *in vitro*. Devido à ocorrência disseminada da infecção por HPV, são necessários métodos para a detecção, prevenção e tratamento da infecção viral.

Carter *et al* (Virology 182, 513-521 (1991)) descrevem a expressão de proteínas de HPV em levedura.

Roseto *et al* (J. Gen. Virol. 65, 1319-1324 (1984) descrevem anticorpos monoclonais que reconhecem o polipéptido viral estrutural principal de HPV-1.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É proporcionada uma proteína da cápside principal L1 produzida recombinantemente que imita os epítopos conformacionais neutralizantes presentes em viriões de papiloma humanos e animais. A proteína recombinante reproduz a antigenicidade da partícula viral infecciosa intacta. A proteína recombinante pode ser utilizada para imunoprecipitar anticorpos a partir do soro de pacientes infectados ou vacinados com PV. São igualmente proporcionados anticorpos neutralizantes contra a proteína recombinante. Os anticorpos são úteis para o diagnóstico e o tratamento de infecção por papilomavírus. A invenção proporciona adicionalmente vacinas subvirais para a prevenção de infecção por papilomavírus em seres humanos e animais.

A invenção proporciona uma proteína L1 de papilomavírus (PV) humano produzida recombinantemente, isolada, ou um seu fragmento, em que a referida proteína ou o seu fragmento proporcionam os epítopos conformacionais presentes em viriões de papilomavírus humanos intactos, e reagem com anticorpos monoclonais que reagem com viriões de HPV intactos mas não reagem com viriões de HPV fragmentados, e em que a referida proteína ou o seu fragmento são capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra viriões de papilomavírus.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Reactividade de anti-soros policlonais de coelho e anticorpos monoclonais de ratinho com HPV-1 fragmentado por SDS, determinada por análise de imunotransferência ("*immunoblot*").

Viriões de HPV-1 purificados foram desnaturados com SDS e as proteínas suas constituintes foram separadas por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas de HPV-1 foram então transferidas electroforeticamente para nitrocelulose e feitas reagir com diluições de 1:100 dos anti-soros de coelho ou anticorpos monoclonais (fluido ascítico). O MAB45, que foi produzido na forma de sobrenadante de hibridoma, foi diluído apenas de 1:10. A reactividade de anticorpos primários foi detectada utilizando IgG de cabra anti-coelho ou anti-ratinho (Bio-Rad) marcada com fosfatase alcalina numa diluição de 1:1000 em PBSA. Verificou-se que apenas o anti-soro #3 de coelho e o MAB45, ambos reconhecendo viriões de HPV-1 desnaturados por ELISA, reagiam significativamente com a proteína L1 desnaturada (veja-se a seta).

Figura 2. Construção do vector de SV40, pSJ-1, que expressa o gene de L1 de HPV-1.

O gene de L1 de HPV-1 foi amplificado a partir do ADN clonado de HPV-1 utilizando iniciadores oligonucleotídicos 5' e 3' que continham locais para as enzimas de restrição XhoI e BamHI, respectivamente. O plasmídeo, designado por pSJ-1, continha o gene de L1 de HPV-1 expresso pelo promotor tardio de SV40. O plasmídeo continha também a origem de replicação (ori) de SV40 assim como o intrão VP1 e sinais de poliadenilação tardios de SV40. Todo o gene de L1 de pSJ-1 foi sequenciado na sua totalidade e verificou-se ser idêntico à sequência genómica de L1 de HPV-1.

Figura 3. Imunoprecipitação de proteína L1 de HPV-1 a partir de células COS transfectadas com pSJ-1.

Células COS, crescidas em placas de plástico de 10 cm de diâmetro, foram transfectadas quando estavam 80% confluentes,

com 10 µg de ADN do plasmídeo pSJ-1 utilizando uma técnica de precipitação com fosfato de cálcio (Graham, F.L., e van der Eb., A.J., Virology 52:456-467 (1973). Passadas 48 h, as células foram metabolicamente marcadas com 500 µCi/ml de ^{35}S-metionina durante 4 h em 2,5 ml de meio isento de cisteína e metionina. As células foram então lavadas com PBS, extractadas com tampão RIPA e imunoprecipitadas com os anti-soros de coelho ou anticorpos monoclonais de ratinho indicados. As proteínas imunoprecipitadas foram então analisadas por electroforese em gel de SDS e autorradiografia. Todos os anti-soros policlonais imunes e anticorpos monoclonais foram capazes de imunoprecipitar a proteína L1 (veja-se a seta). As pistas 1 e 4 mostram a ausência de proteína L1 quando os extractos foram precipitados com soro de coelho não imune (pista 1) ou com soro murino não imune (pista 4).

Figura 4. Coloração imunofluorescente de células COS transfectadas com pSJ-1.

Células COS crescidas em lamelas de vidro foram transfectadas com 10 µg de pSJ-1 como descrito na Figura 3. Após 48 h, lavaram-se as lamelas com PBS, fixaram-se em acetona fria e fizeram-se reagir com diluições de 1:250 de anti-soros de coelho ou anticorpos monoclonais de ratinho. Os anticorpos primários que reagiram foram corados com anti-IgG de cabra marcada com FITC na diluição de 1:10 em PBS (Cappel). Os núcleos de aproximadamente 5-10% de células COS transfectadas foram positivos por imunofluorescência. Os anticorpos avaliados foram R#3 (painel a), R#7 (painel b), MAB45 (painel c), 334B6 (painel d), 339B6 (painel e), D54G10 (painel f) e 405D5 (painel g). Nenhum dos anti-soros foi reactivo com células COS transfectadas com o vector progenitor pSVL a que falta o gene de L1 de HPV-1, incluindo R#3 (painel h).

DESCRIÇÃO DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

São proporcionados métodos e composições para a prevenção, detecção e tratamento de infecção por papilomavírus (PV). Os métodos são baseados na produção de uma proteína da cápside principal L1 recombinante que é capaz de reproduzir os epítopos conformacionais neutralizantes presentes em viriões

de papilomavírus humanos e animais. A invenção refere-se ainda a fragmentos antigénicos destas proteínas L1 recombinantes.

Embora os papilomavírus infectem uma ampla variedade de espécies de vertebrados, exibem uma notável conservação de organização genómica e composição de proteínas da cápside. Os papilomavírus consistem em pequenos (cerca de 55 nm) viriões sem envelope que circundam um genoma de ADN circular de cadeia dupla. O genoma tem aproximadamente 8000 pb de comprimento e pode ser dividido nas regiões "precoce" e "tardia" de igual comprimento. A região "precoce" codifica 7-8 genes envolvidos em processos como a replicação do ADN viral (os genes El e E2), transcrição de ARN (o gene E2) e transformação de células (os genes E5, E6 e E7). A região "tardia" codifica duas proteínas estruturais, L1 e L2, que representam as proteínas da cápside principal e minoritária, respectivamente. Todos os genes "precoces" e "tardios" são transcritos a partir da mesma cadeia de ADN viral.

Existe uma variedade de tipos de PV conhecidos na especialidade. Adicionalmente, tipos particulares de PV estão associados a infecções particulares tais como verrugas planas, verrugas cutâneas, epidermodisplasia verruciforme, lesões e cancro cervical. Foram identificados mais de 50 diferentes tipos de HPV em lesões clínicas por estudos de homologia de sequências nucleotídicas virais. Veja-se, por exemplo, Jenson *et al*, "Human papillomaviruses" em: Belshe, R. ed., Textbook of human virology, Second Edition, MASS: PSG, 1989:951 e Kremsdorf *et al*, J. Virol., 52:1013-1018 (1984). O tipo de HPV determina, em parte, o local da infecção, as características patológicas e o aparecimento clínico assim como o decurso clínico da lesão respectiva.

A proteína L1 representa a proteína mais altamente conservada de todas as proteínas de papilomavírus. A sequência nucleotídica dos quadros de leitura abertos de L1 de BPV-1, HPV-1A e HPV-6B são proporcionados na Patente U.S. 5,057,411, cuja descrição é aqui incorporada por referência. Adicionalmente, nota-se que proteínas L1 e proteínas de fusão foram produzidas recombinantemente. Contudo, antes da presente invenção, não se sabia que podiam ser produzidas proteínas L1 com fidelidade suficiente para manter uma conformação

equivalente à que é encontrada em viriões de papilomavírus intactos. Anteriormente, a proteína L1 recombinante era produzida na forma de moléculas lineares que eram incapazes de proteger contra a infecção por papilomavírus. A presente invenção, pelo contrário, proporciona a proteína conformacionalmente correcta que é capaz de induzir anticorpos neutralizantes que protegem contra papilomavírus animais e humanos.

Porque se crê que existe pouca ou nenhuma imunidade cruzada entre tipos de PV e a imunidade à infecção é específica do tipo de PV, será necessário produzir proteína L1 recombinante para cada tipo específico de PV para o qual sejam necessários protecção ou tratamento. Contudo, devido à homologia entre as proteínas e genes de L1, podem ser utilizadas técnicas de hibridação para isolar o gene de L1 particular de interesse. Sondas nucleotídicas seleccionadas de regiões da proteína L1 que se demonstrou apresentarem homologia de sequência, podem ser utilizadas para isolar outros genes de L1. São conhecidos na especialidade métodos para a hibridação. Veja-se, por exemplo, Nucleic Acid Hybridization. A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Maniatis *et al*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982); e Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Sambrook *et al*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989). Alternativamente, podem ser utilizados métodos de PCR para amplificar genes ou fragmentos de genes de L1. Veja-se, por exemplo, Patente U.S. 4,683,195; 4,683,202; e 4,800,159.

Partículas de vírus podem também ser isoladas para um tipo particular de papilomavírus, o ADN clonado e as sequências de ácido nucleico que codificam proteínas L1 isoladas. Foram reportados métodos para isolamento de partículas virais e clonagem de ADN de vírus. Veja-se, por exemplo, Heilman *et al* (1980) J. Virology 36:395-407; Beaudenon *et al* (1986) Nature 321:246-249; Georges *et al* (1984) J. Virology 51:530-538; Kremsdorf *et al* (1984) J. Virology 52:1013-1018; Clad *et al* (1982) Virology 118:254-259; DeVilliers *et al* (1981) J. Virology 40:932-935; e o pedido de patente europeia 0133123.

Alternativamente, a proteína L1 para um papilomavírus particular pode ser isolada, a sequência de aminoácidos determinada e sondas de ácido nucleico construídas com base na sequência de ADN prevista. Estas sondas podem ser utilizadas no isolamento do gene de L1 a partir de uma biblioteca do ADN de papilomavírus. Veja-se, por exemplo, Suggs *et al* (1981) PNAS 78(11):6613-6617. Veja-se também, Young e Davis (1983) PNAS 80:1194.

Como a proteína L1 recombinante tem que ter a conformação adequada para imitar a da partícula do vírus intacto, o sistema de expressão é crucial para a invenção. Tem que ser utilizado um sistema de expressão que produza proteína L1 na conformação correcta. Ou seja, a proteína L1 recombinante reproduz a antigenicidade de partículas de vírus infeccioso intacto. Estes sistemas de expressão deverão também produzir elevados níveis de proteína da cápside. Geralmente, o sistema de expressão compreenderá um vector possuindo a proteína L1 de interesse e as regiões reguladoras apropriadas assim como uma célula hospedeira adequada. Tipicamente, um hospedeiro adequado será um que proporcione mecanismos eucariotas para o processamento das proteínas.

Idealmente, utiliza-se um promotor forte para uma expressão elevada da proteína recombinante. O vector pSVL tem particular interesse. O vector pSVL contém uma origem de replicação de SV40 e quando transfectado em células COS, que expressam antigénio T Grande, replica até um elevado número de cópias.

Alternativamente, podem ser utilizados vectores de baculovírus. Um sistema de baculovírus oferece a vantagem de que uma grande percentagem de células podem ser induzidas a expressar a proteína devido à utilização de técnicas de infecção em vez de transfecção. Embora o baculovírus seja um vírus de insectos e cresça em células de insecto (SF9), estas células retêm muitos dos mecanismo eucariotas para o processamento de proteínas, incluindo glicosilação e fosforilação, que podem ser importantes para a criação de proteínas com a conformação apropriada. Os sistemas de vector de baculovírus são conhecidos na especialidade. Veja-se, por

exemplo, Summers e Smith, Texas Agricultural Experimental Bulletin No. 1555 (1987); Smith *et al*, Mol. Cell Biol, 3:2156-2165 (1985); Posse, Virus Research 5:4359 (1986); e Matsuura, J. Gen. Virol. 68:1233-1250 (1987).

Para expressão num sistema de expressão apropriado, o gene de L1 é operativamente ligado a um vector de expressão e introduzido numa célula hospedeira para permitir a expressão da proteína L1 por essa célula. O gene com as regiões reguladoras apropriadas será proporcionado na orientação e quadro de leitura correctos para permitir a expressão. Métodos para a construção de genes são conhecidos na especialidade. Veja-se, em particular, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Sambrook *et al*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989) e as referências aí citadas.

Podem ser empregues uma ampla variedade de sequências reguladoras da transcrição e da tradução. Os sinais podem ser derivados de fontes virais, onde os sinais reguladores estão associados com um gene particular que tem um elevado nível de expressão. Ou seja, serão utilizados promotores fortes, por exemplo, de fontes virais ou de mamífero. Desta maneira, as condições óptimas para a realização da invenção incluem a clonagem do gene de L1 num vector de expressão que irá sobre-expressar epítopos conformacionalmente dependentes da proteína L1 em células alvo transfectadas ou infectadas.

A proteína L1 recombinante é confirmada por reacção com anticorpos ou anticorpos monoclonais que reagem com, ou reconhecem, epítopos conformacionais presentes no virião intacto. Desta maneira, pode-se verificar se a proteína L1 possui a conformação adequada. Assim, podem ser testados outros vectores de expressão e sistemas de expressão para utilização na invenção.

Uma vez expressa a proteína L1 com a conformação adequada, podem ser criados anticorpos contra a proteína recombinante ou seus fragmentos antigénicos. Os anticorpos da presente invenção podem ser preparados utilizando técnicas conhecidas. Os anticorpos monoclonais são preparados utilizando a tecnologia do hibridoma como descrito por Kohler

et al, Nature 256:495 (1975); Kohler *et al*, Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler *et al*, Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling *et al*, em: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsavier, NY, páginas 563-681 (1981). Estes anticorpos produzidos pelos métodos da invenção são capazes de proteger contra a infecção por PV.

O termo "anticorpo" inclui anticorpos tanto policlonais como monoclonais, assim como seus fragmentos, tais como, por exemplo, fragmentos Fv, Fab e $F(ab)_2$ que são capazes de ligar antigénios ou haptenos. Estes fragmentos são tipicamente produzidos por clivagem proteolítica, tal como com papaína, para produzir fragmentos Fab ou pepsina para produzir fragmentos $F(ab)_2$. Alternativamente, podem ser produzidos fragmentos de ligação a haptenos através da aplicação de tecnologia de ADN recombinante ou através de química sintética.

Tal como indicado, podem ser empregues anticorpos tanto policlonais como monoclonais de acordo com a presente invenção. Têm especial interesse para a presente invenção os anticorpos que são produzidos em seres humanos ou são "humanizados" (*i.e.*, não imunogénicos num ser humano) por tecnologia recombinante ou outra. Os anticorpos humanizados podem ser produzidos, por exemplo, colocando uma porção imunogénica de um anticorpo com uma porção correspondente, mas não imunogénica, de anticorpos quiméricos. Veja-se, por exemplo, Robinson *et al*, pedido internacional de patente PCT/US86/02269; Akira *et al*, pedido de patente europeia 184,187; Taniguchi, M., pedido de patente europeia 171,496; Morrison *et al*, pedido de patente europeia 173,494; Neuberger *et al*, pedido PCT WO86/01533; Cabilly *et al*, pedido de patente europeia 125,023; Better *et al*, Science 240:1041-1043 (1988); Liu *et al*, PNAS 84:3439-3443 (1987); Liu *et al*, J. Immunol. 139:3521-3526 (1987); Sun *et al*, PNAS 84:214-218 (1987); Nishimura *et al*, Cancer Research 47:999-1005 (1987); Wood *et al*, Nature 314:446-449 (1985); e Shaw *et al*, J. National Cancer Inst. 80:1553-1559 (1988). Revisões gerais de anticorpos quiméricos "humanizados" são proporcionados por Morrison, S.L., Science 229:1202-1207 (1985) e por Oi *et al*, BioTechniques 4:214 (1986).

Os anticorpos, ou fragmentos de anticorpos, da presente invenção, podem ser utilizados para detectar, diagnosticar, serotipar e tratar a infecção por papilomavírus. Desta maneira, os anticorpos ou fragmentos de anticorpos são particularmente adequados para utilização em imunoensaios.

Os anticorpos, ou seus fragmentos, podem ser marcados utilizando quaisquer de uma variedade de marcadores e métodos de marcação. Os exemplos de tipos de marcadores que podem ser utilizados na presente invenção incluem, mas não se lhes limitam, marcadores enzimáticos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos não radioactivos, marcadores fluorescentes, toxinas marcadoras e marcadores quimioluminescentes.

Os exemplos de marcadores enzimáticos adequados incluem malato-hidrogenase, nuclease de estafilococos, delta-5-esteróide-isomerase, álcool-desidrogenase de levedura, alfa-glicerol-fosfato-desidrogenase, triose-fosfato-isomerase, peroxidase, fosfatase alcalina, asparaginase, glucose-oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-fosfato-desidrogenase, glucoamilase, acetilcolina-esterase, etc.

Os exemplos de marcadores radioisotópicos adequados incluem ^{3}H, ^{125}I, $^{131}1$, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, ^{51}Cr, ^{57}To, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{152}Eu, ^{90}Y, ^{67}Cu, ^{217}Ci, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{47}Sc e ^{109}Pd.

Os exemplos de marcadores fluorescentes adequados incluem um marcador ^{152}Eu, um marcador de fluoresceína, um marcador de isotiocianato, um marcador rodamina, um marcador de ficoeritrina, um marcador de ficocianina e um marcador de aloficocianina, um marcador de o-ftaldeído, um marcador de fluorescamina, etc.

Os exemplos de toxinas marcadoras adequadas incluem toxina diftérica, ricina e toxina colérica. Os exemplos de marcadores quimioluminescentes incluem um marcador de luminal, um marcador de isoluminal, um marcador de éster de acridínio aromático e um marcador de imidazole e um marcador de sal de acridínio, um marcador de éster oxalato, um marcador de

luciferina, um marcador de luciferase, um marcador de aequorina, etc.

As pessoas competentes na matéria conhecerão outros marcadores adequados que podem ser empregues de acordo com a presente invenção. A ligação destes marcadores a anticorpos ou seus fragmentos pode ser realizada utilizando técnicas padrão vulgarmente conhecidas das pessoas competentes na matéria. Técnicas típicas estão descritas por Kennedy, J.H., *et al*, Clin. Chim. Acta 70:1-31 (1976), e Schurs, A.H.W.M., *et al*, Clin. Chim. Acta 81:1-40 (1977). As técnicas de acoplamento mencionadas neste último são o método do glutaraldeído, o método do periodato, o método da dimaleimida, o método do éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxi-succinimida, todos estes métodos aqui incorporados por referência.

A detecção dos anticorpos (ou fragmentos de anticorpos) da presente invenção pode ser melhorada através da utilização de transportadores. Transportadores bem conhecidos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, *nylon*, amilases, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetite. A natureza do transportador pode ser solúvel em alguma extensão ou insolúvel para os fins da presente invenção. Os peritos na especialidade encontrarão muitos outros transportadores adequados para ligação ao anticorpo monoclonal, ou serão capazes de determinar os mesmos utilizando experimentação de rotina.

Criando anticorpos contra proteínas L1 que imitam a antigenicidade dos viriões de papilomavírus, os anticorpos criados contra estas proteínas recombinantes são anticorpos neutralizantes e protectores. Os anticorpos são capazes de prevenir uma infecção subsequente pelo mesmo tipo de papilomavírus do qual a proteína L1 foi derivada. Ou seja, se uma proteína L1 recombinante de papilomavírus do tipo 16 for utilizada para criar anticorpos, estes anticorpos irão proteger contra a infecção subsequente por papilomavírus do tipo 16. Assim, o método da presente invenção proporciona a prevenção, tratamento ou detecção de qualquer tipo de HPV.

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para determinar os tipos de HPV por serotipagem como estabelecido

em Jenson *et al*, J. Cutan. Pathol. 16:54-59 (1989). A determinação do tipo de HPV pode ser clinicamente importante para a determinação do potencial biológico putativo de algumas lesões associadas a HPV produtivamente infectadas, particularmente lesões do tracto anogenital benignas e pré-malignas de baixo grau. Assim, a presente invenção torna possível tratar e prevenir a infecção por qualquer tipo de PV a partir do qual possa ser obtido o gene de L1 e possam ser obtidos anticorpos neutralizantes.

A invenção proporciona também composições farmacêuticas pois os anticorpos podem também ser utilizados para tratar infecções por papilomavírus em mamíferos. Os anticorpos ou anticorpos monoclonais podem ser utilizados em composições farmacêuticas para direccionar terapias de fármacos para locais de infecção por PV. Desta maneira, os fármacos ou compostos de interesse são ligados ao anticorpo para permitir o direccionamento dos fármacos ou compostos. Estão disponíveis métodos para a ligação de anticorpos a fármacos ou compostos. Veja-se, por exemplo, EP 0,146,050; EP 0,187,658; e Patente U.S. 4,673,573; 4,368,149; 4,671,958 e 4,545,988.

Estas terapias com fármacos incluem agentes antivirais, agentes tóxicos e compostos foto-activáveis, tais como cumarina, psoraleno, ftalocianimas, azul de metileno, eosina, tetraciclina, clorofilas, porfirinas e semelhantes. Estes grupos podem ser ligados aos anticorpos através de grupos de ligação apropriados. Conjugados de anticorpos contendo um composto foto-activável são administrados seguidos de irradiação das células alvo.

O anticorpo ou os conjugados de anticorpo da presente invenção podem ser formulados de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmaceuticamente úteis tais como por mistura com um veículo transportador farmaceuticamente aceitável. São descritos veículos adequados e a sua formulação, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (16th Ed., Osol, A.Ed., Mack Easton PA (1980)). Para formar uma composição farmaceuticamente aceitável adequada para uma administração eficaz, estas composições conterão uma quantidade eficaz de anticorpo, sozinho ou com uma quantidade adequada de veículo transportador.

As composições terapêuticas ou de diagnóstico da invenção serão administradas a um indivíduo em quantidades terapeuticamente eficazes. Ou seja, numa quantidade suficiente para diagnosticar ou tratar a infecção por PV. A quantidade eficaz variará de acordo com o peso, o sexo, a idade e o historial médico do indivíduo. Outros factores incluem, a gravidade da condição do paciente, o tipo de PV, o modo de administração, e similares. Geralmente, as composições serão administradas em dosagens que variam de cerca de 0,01 a cerca de 2 picomoles/ml, mais geralmente de cerca de 0,001 a cerca de 20 picomoles/ml.

As composições preparadas farmaceuticamente podem ser proporcionadas a um paciente por qualquer meio conhecido na especialidade incluindo oral, intranasal, subcutânea, intramuscular, intravenoso, intra-arterial, parentérico, etc.

Outro aspecto da presente invenção envolve o desenvolvimento de vacinas específicas do tipo de PV. As vacinas da invenção são aquelas que contêm os determinantes antigénicos necessários para induzir a formação de anticorpos neutralizantes no hospedeiro; possuem elevado potencial imunogénico; são suficientemente seguras para serem administradas sem perigo de infecção clínica; estão desprovidas de efeitos secundários tóxicos; são adequadas para administração por uma via eficaz, por exemplo, oral, intranasal, tópica ou parentérica; imitam as circunstâncias da infecção natural; são estáveis sob condições de armazenagem a longo prazo; e, são compatíveis com os transportadores inertes usuais de vacinas.

As vacinas da presente invenção incluem as proteínas L1 recombinantes conformacionalmente correctas, ou seus fragmentos, que proporcionam os epítopos conformacionais presentes nos viriões intactos. Estas sequências de aminoácidos da proteína L1 constituem a componente antigénica da vacina. Pode ser necessário ou preferível ligar covalentemente o antigénio a um transportador imunogénico, *i.e.*, albumina sérica bovina ou hemocianina de lapa. As vacinas da invenção podem ser administradas a qualquer

mamífero susceptível a infecção pelo papilomavírus. Os animais mamíferos, humanos e não, podem beneficiar como hospedeiros.

A administração das vacinas pode ser parentérica, mas preferivelmente é oral ou intranasal, dependendo da via natural da infecção. A dosagem administrada pode depender da idade, saúde, peso, tipo de tratamento concorrente, se algum, e natureza e tipo de papilomavírus. A vacina pode ser empregue em formas de dosagem como cápsulas, soluções líquidas, suspensões ou elixires, para administração oral, ou formulações líquidas estéreis tais como soluções ou suspensões para utilização parentérica ou intranasal. É utilizado preferivelmente um transportador inerte, imunologicamente aceitável, tal como solução salina ou solução salina tamponada com fosfato.

As vacinas serão administradas em quantidades terapeuticamente eficazes. Ou seja, em quantidades suficientes para produzir uma resposta imunológica protectora. Geralmente, as vacinas serão administradas em dosagens que variam de cerca de 0,1 mg de proteína a cerca de 20 mg de proteína, mais geralmente de cerca de 0,01 mg a cerca de 100 mg de proteína. Podem ser administradas dosagens únicas ou múltiplas.

O método da presente invenção torna possível a preparação de vacinas subvirais para a prevenção da infecção por papilomavírus. Adicionalmente, seguindo os métodos da invenção, podem ser preparadas vacinas contra qualquer tipo imunogénico de papilomavírus específico.

Como pode ser associado mais do que um tipo de PV às infecções por PV, as vacinas podem compreender aminoácidos antigénicos de L1 de mais do que um tipo de PV. Por exemplo, como os HPV 16 e 18 estão associados aos carcinomas cervicais, uma vacina contra neoplasias cervicais pode compreender proteína L1 de HPV 16; de HPV 18; ou de ambos, HPV 16 e 18.

De facto, conhecem-se uma variedade de neoplasias associadas a infecções por PV. Por exemplo, os HPV 3a e 10 foram associados a verrugas planas. Vários tipos de HPV foram reportados associados a epidermodisplasia verruciforme (EV) incluindo os HPV 3a, 5, 8, 9, 10 e 12. Os HPV 1, 2, 4 e 7 foram reportados associados a verrugas cutâneas e os HPV 6b,

11a, 13 e 16 estão associados a lesões das membranas mucosas. Veja-se, por exemplo, Kremsdorf *et al*, J. Virol., 52: 1013-1018 (1984); Beaudenon *et al*, Nature 321:246-249 (1986); Heilman *et al*, J. Virol. 36:395-407 (1980); e DeVilliers *et al*, J. Virol. 40:932-935 (1981). Assim, as formulações de vacina podem compreender uma mistura de proteínas L1 de diferentes tipos de PV dependendo da protecção pretendida.

Da mesma maneira, as composições farmacêuticas podem conter uma mistura de anticorpos contra diferentes tipos de PV.

Como indicado, a proteína L1 da invenção pode ser utilizada para serotipagem. Ou seja, podem ser produzidos anticorpos monoclonais capazes de reagir com proteína L1 conformacionalmente correcta que podem ser utilizados para serotipar o PV. Desta maneira, um tecido ou soro podem ser obtidos a partir de um paciente e analisados quanto à capacidade para imunoprecipitar esses anticorpos.

Num sentido mais lato, os anticorpos podem ser utilizados para rastreio serológico. Desta maneira, populações de indivíduos podem ser testadas quanto à capacidade para imunoprecipitar anticorpos conformacionalmente correctos. Podem determinar-se respostas de anticorpos a tipos de HPV específicos.

A invenção presta-se à formulação de *kits*, particularmente para a detecção e serotipagem de HPV. Estes *kits* compreenderiam um suporte compartimentado para receber em estreito confinamento um ou mais recipientes, cada recipiente com anticorpos para um tipo particular de HPV ou uma mistura de anticorpos para uma variedade de tipos de HPV conhecidos. Outros recipientes podem conter meios para detecção tais como substratos de enzimas, antigénio/anti-anticorpo marcado e semelhantes.

Para os testes serológicos, os *kits* compreenderão a proteína L1 recombinante conformacionalmente correcta. Estes *kits* poderão também ser utilizados para vacinas.

Tendo agora descrito genericamente a invenção, os exemplos seguintes são oferecidos a título de ilustração e não se pretendem limitantes a menos que especificado em contrário.

PARTE EXPERIMENTAL

Exemplo 1
Materiais e Métodos

Animais

Adquiriram-se ratinhos fêmea atímicas (nu/nu) a Harlan Sprague Dawley, Madison WI, e utilizaram-se para transplantes de xenoenxertos quando atingiram 6 a 8 semanas de idade.

Vírus

Purificou-se BPV-1 a partir de fibropapilomas cutâneos bovinos experimentalmente induzidos como descrito por Lancaster, W.D. e Olson, D., "Demonstration of two distinct classes of bovine pappilomavirus", Virology, 89, 372-279 (1978) (1978). O vírus foi armazenado a -80°C até ser utilizado.

Anticorpos

Todas as amostras de soro foram inactivadas por calor a 56°C durante 30 min. Cada preparação de anticorpos foi avaliada quanto a reactividade com partículas de BPV-1 intactas e fragmentadas (Tabela I) antes dos testes quanto a neutralização da transformação induzida por BPV-1 de células C127 e xenoenxertos.

Anticorpos policlonais bovinos.

Os soros bovinos foram obtidos a partir de vitelos, quer vacinados com proteínas de fusão de L1 de BPV-1 quer experimentalmente infectados com BPV-1.

Imunizaram-se vitelos Holstein X Angus com diferentes formulações de uma vacina de L1::B-galactosidase recombinante de BPV-1 (Jin, X.W., Cowsert, L., Marshall D., Reed, D., Pilacinski, W., Lim, L. e Jenson, A.B., "Bovine serological response to a recombinant BPV-1 major capsid protein vaccine", Intervirology, 31, 345-354 (1990)). O gene de L1 clonado começa 76 pb a jusante do codão de início do quadro de leitura aberto de L1 no nucleótido 5686 e está fundido no terminal com

o gene da B-galactosidase de *E. coli* (Pilacinski, W.P., Glassman, D.L., Richard, A.K. SadowsM, P.L. e Alan, K.R., "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the bovine papillomavirus L1 e L2 open reading frames", Bio/Technol., 2, 356-360 (1984)). Vacinaram-se os vitelos nos dias 0 a 21, e provocaram-se por inoculação intradérmica de 2 locais com 10^{10} partículas de BPV-1 no dia 56 (Jin, X.W., Cowsert, L., Marshall D., Reed, D., Pilacinski, W., Lim, L. e Jenson, A.B., "Bovine serological response to a recombinant BPV-1 major capsid protein vaccine", Intervirology, 31, 345-354 (1990)). Sangraram-se os vitelos nos dias 3 (designado pré-sangria), 55 (sangria 1) e 104 (sangria 2) do ensaio e testaram-se os soros quanto a reactividade com partículas de BPV-1 intactas e fragmentadas, por ELISA. Embora 90% e 58% dos vitelos desenvolvessem respostas de anticorpos contra epítopos da cápside de BPV-1 internos e externos, respectivamente, todos os vitelos desenvolveram fibromas.

Dois bois castrados (926 e 921), adquiridos em vitelos de uma manada de gado confinada sem exposição anterior a BPV-1 ou BPV-2, foram inoculados em múltiplos locais com homogenatos finamente divididos de fibropapilomas induzidos por BPV-1. Os fibropapilomas desenvolveram-se nos locais escarificados e persistiram durante vários períodos de tempo antes de sofrerem regressão espontânea. Os soros utilizados nesta experiência foram recolhidos durante os primeiros sinais de regressão dos fibropapilomas em ambos os animais.

Anticorpos policlonais de coelho.

Prepararam-se anti-soros de coelho por inoculação com viriões de BPV-1 ou BPV-2 intactos, ou com partículas de BPV-1 desnaturadas e depois sangraram-se 2 semanas após a imunização final (Jenson, A.B. Rosenthal, J.D., Olson, C, Pass, F.W., Lancaster W.D. e Shah, K., "Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species", J. Nat. Cancer Inst., 64, 495-500 (1980), Jenson, A.B., Kurman, R.J. e Lancaster, W.D., "Detection of papillomavirus common antigens in lesions of the skin and mucosa", Clinics In Dermatol., 3, 56-63 (1985); Cowsert, L.M., Lake, P. e Jenson, A.B., "Topographical and conformacional epitopes of bovine papillomavirus type 1 defined by monoclonal antibodies", J. Nat. Cancer Inst., 79 1053-1057 (1987)).

Anticorpos monoclonais murinos.

Utilizaram-se também dois MAb murinos, 13D6 e JG, para testar a neutralização. O 13D6 reconhece epítopos conformacionais em BPV-1, BPV-2 e partículas intactas papilomavírus de veado (DPV) (Cowsert, L.M., Lake, P. e Jenson, A.B., "Topographical and conformational epitopes of bovine papillomavirus type 1 defined by monoclonal antibodies", J. Nat. Cancer Inst., 79 1053-1057 (1987)), enquanto o JG reconhece um epítopo linear específico do tipo de BPV-1 interno à cápside (resultados não apresentados).

TABELA I

REACTIVIDADE EM ELISA DE SOROS BOVINOS, DE COELHO E HUMANOS E MAb MURINOS COM PARTÍCULAS DE BPV-1 INTACTAS E FRAGMENTADAS

Amostras de MAb ou soro[1]	Partículas de BPV-1	
	Intactas	Fragmentadas
Vitelos vacinados[2]		
163		
Pré-sangria	0,002	0,016
1	0,041	0,925
2	0,312	1,472
173		
Pré-sangria	0,036	0,066
1	0,101	1,222
2	0,182	1,249
Coelho[3]		
NRS	0,065	0,073
BPV-1	1,454	0,095
BPV-2	1,621	0,085
BPV-1 (SDS)	0,319	1,358
MAb		
13D6	0,629	0,004
JG	0,004	0,423
Bois castrados hiper-imunes[4]		
926	0,296	0,033
921	0,397	0,202
Humano		
1	0,964	0,036
2	0,554	0,247

[1]O RBPV-1 e o RBPV-2 foram diluídos de 1/2000; todas as outras amostras foram diluídas de 1/50. -[2]Pre, soros pré-sangria de vitelos 163 e 173; 1, soros de vitelos 163 e 173 no momento da provocação com viriões de BPV-1; 2, soros de vitelos 163 e 173 no final do ensaio da vacina. -[3]NRS, soro de coelho normal; BPV-1 (SDS) soro de coelho preparado contra BPV-1 fragmentado por SDS. -[4]Bois castrados (926 e 921), soro de boi castrado inoculado em 24 diferentes locais cutâneos com homogenatos de BPV-1.

Ensaios de neutralização

Dois ensaios (xenoenxertos em ratinhos atímicos e culturas de células murinas C127) para detecção de neutralização mediada por anticorpos de viriões de PV infecciosos, foram comparados quanto à especificidade.

Ensaio de xenoenxerto.

Para ensaiar a neutralização da infecciosidade de BPV-1, adicionou-se uma diluição de 1:10 de anti-soros policlonais em PBS a alíquotas de BPV-1 infeccioso em PBS e incubou-se durante 1 h a 37°C. Incluiu-se BPV-1 em apenas PBS como controlo positivo para a infecciosidade. Adicionaram-se a cada diluição pedaços de pele bovina fetal (peças de 5 a 10 x 2 x 2 mm) e incubou-se durante 1 h a 37°C.

Transplantaram-se os pedaços sob a cápsula renal de ratinhos atímicos e determinou-se a dimensão (em mm) do quisto e a morfologia do seu epitélio de revestimento após 60 dias. Calcularam-se as dimensões dos quistos como média geométrica dos diâmetros (GMD) calculando a raiz cúbica de comprimento x largura x altura dos quistos em mm.

Realizou-se a análise estatística determinando as médias dos GMD dos quistos e dos fibropapilomas para cada anti-soro e comparou-se com as de controlos não tratados utilizando o teste t de Student.

Ensaio de células C127.

Obtiveram-se células murinas C127 na ATCC, Rockville, MD, e cresceram-se como descrito por (Dvoretzky, I., Shober, R., Chattopadhy, S.K. e Lowy, D.R., "A quantitative *in vitro* focus-forming assay for bovine papillomavirus", Virology, 103, 369-375 (1980)). Os ensaios de neutralização foram realizados em placas de Petri (100 mm). As células C127 foram semeadas a aproximadamente 10^5 a 5 x 10^5 células, que se deixaram ficar 75 a 80% confluentes, e depois incubaram-se viriões de BPV-1 (10^3 unidades formadoras de focos [FFU]) com 0,5 ml de DMEM como controlo positivo para a infecciosidade ou um volume igual do MAb ou do anti-soro policlonal (diluído de 1:5) a 37°C durante 1 h antes da inoculação de células C127. Após 1-1/2 h de adsorção, adicionou-se MEM suplementado com FBS a 10%

a cada placa. Reconstituiu-se o meio no dia seguinte e depois 3 vezes por semana durante 17 a 19 dias, altura em que se fixaram as placas e coraram com azul de metileno a 0,1% em metanol para contar o número de FF por placa. Os controlos incluíam soros de vitelo fetal e soro de um boi castrado que não tinha historial de fibropapilomas.

RESULTADOS

A especificidade de 2 sistemas de ensaio diferentes, xenoenxertos e células C127, para medição da neutralização da infecção por BPV-1, foi comparada utilizando soros animais e MAb murinos seleccionados. Os soros e os MAb testados foram: (1) soros de coelhos e gado vacum imunizados e/ou infectados com viriões de BPV-1 e BPV-2 intactos (os sistemas imunitários foram expostos a epítopos da superfície da cápside de BP-1 tanto conformacionais como lineares); (2) soros de coelhos e gado vacum imunizados com viriões de BPV-1 desnaturados e proteínas de fusão de L1, respectivamente (os sistemas imunitários foram expostos a epítopos da cápside de BPV-1 desnaturados/lineares); (3) soros seleccionados de seres humanos que reagiam com BPV-1 intacto; e (4) MAb que definem epítopos conformacionais da superfície de BPV-1 e epítopos que são internos à cápside de BPV-1.

Topografia de epítopos

Os soros avaliados no nosso estudo foram testados inicialmente quanto a reactividade com cápsides de BPV-1 tanto intactas como fragmentadas, definindo assim a localização topográfica dos correspondentes epítopos como externos ou internos à cápside de BPV-1 como previamente descrito (Cowsert, L.M., Lake, P. e Jenson, A.B., “Topographical and conformacional epitopes of bovine papillomavirus type 1 defined by monoclonal antibodies”, J. Nat. Cancer Inst., 79 1053-1057 (1987)). (Tabela I).

Os soros de coelho produzidos contra viriões de BPV-1 ou BPV-2 intactos e soros de bois castrados inoculados em múltiplos locais com homogenatos infecciosos de BPV-1, induziram fibropapilomas assim como o MAb 13D6 reagiu primariamente com viriões intactos. Os dois soros humanos

seleccionados para este estudo reagiram primariamente com partículas de BPV-1 intactas.

O soro de coelho preparado contra partículas virais de BPV-1 fragmentadas por SDS, e soros (sangria 2) de vitelos 163 e 173 no final do ensaio da vacina, 48 dias após a provocação com viriões de BPV-1, reagiram com partículas virais tanto intactas como fragmentadas. O soro de vitelo 163 (sangria 1), imediatamente antes da provocação com viriões de BPV-1 infecciosos, reagiu apenas com partículas de BPV-1 fragmentadas. O MAb JG reagiu apenas com viriões de BPV-1 fragmentados.

Os soros pré-sangria/normais de coelho e bovino (vitelos 163 e 173) não reagiram com viriões de BPV-1 intactos nem fragmentados, por ELISA.

Ensaios de neutralização

Compararam-se dois ensaios diferentes quanto à neutralização da infecciosidade de BPV-1 pelos soros hiper-imunes e MAb: (i) xenoenxertos em ratinhos atímicos, e (ii) culturas de células C127.

Ensaio de neutralização de xenoenxertos.

Os anti-soros policlonais (não absorvidos) assim como soros de controlo negativo foram testados quanto à neutralização da infecciosidade de BPV-1 de pele bovina fetal transplantada por baixo da cápsula renal de ratinhos atímicos. Determinou-se a neutralização efectiva por comparação da dimensão e morfologia microscópica do quisto (Tabela II).

Incubaram-se pedaços de pele bovina fetal com BPV-1 que tinha sido pré-incubado durante 1 h com diluições dos vários anti-soros policlonais. Enxertaram-se os pedaços sub-renalmente em ratinhos atímicos, e determinaram-se as médias geométricas dos diâmetros médios dos quistos 60 dias mais tarde (Tabela II). Obteve-se uma grande e significativa redução da dimensão dos quistos para os soros de 2 coelhos inoculados com BPV-1 ou BPV-2 intactos e anti-soros policlonais de boi castrado recolhidos de animais com regressão de fibropapilomas induzidos por BPV-1. Nem o anti-soro policlonal do coelho inoculado com partículas de BPV-1

desnaturadas nem os soros bovinos pré-sangria, na provocação ou pós-provocação do estudo de vacinação recombinante em vitelos teve um efeito significativo na dimensão dos quistos na diluição testada. Os soros humanos e os MAb reactivos com partículas de BPV-1 intactas ou epítopos lineares de BPV-1 não resultaram em redução da dimensão dos quistos.

Ensaio de neutralização de células C127.

Soros pré-sangria de coelho e vitelo 163 e 173, soro de coelho hiper-imune preparado contra viriões de BPV-1 fragmentados por SDS, ambos os soros humanos, e soros de vitelo (163 e 173) após vacinação mas imediatamente antes da provocação com BPV-1, não neutralizaram FF de células C127 por viriões de BPV-1 (Tabela III). Contudo, os soros de coelho produzidos por imunização com BPV-1 e BPV-2 intactos tinham títulos de neutralização de 10^6 e 10^4 respectivamente, e os soros de bois castrados hiper-imunes tinham um título de neutralização de 10^6 (926) a 10^3 (921). Os soros de vitelos 163 e 173 no final do ensaio de vacinação tinham um título de neutralização inferior a 10^1, provavelmente devido à exposição a vírus de provocação infecciosos, e não a uma maturação da resposta imunitária contra a vacina.

Nem os soros de vitelo fetal nem o soro de boi castrado adulto seleccionado de animais não imunes inibiram FF em células C127.

TABELA II

DIMENSÃO DOS QUISTOS E MORFOLOGIA DE XENOENXERTOS EM DESENVOLVIMENTO INDUZIDOS POR BPV-1 APÓS VÁRIOS PRÉ-TRATAMENTOS COM SORO DE BPV-1 INFECCIOSO

Amostras de soro ou MAb[1]	Dimensão do quisto[2] (média e EPM em mm)	Morfologia[3]
Vitelos vacinados		
163		
Pré-sangria	5,8 (0,9)[4]	5/6/6
1	4,0 (0,4)	4/4/4
2	4,6 (0,5)[4]	5/6/6
173		
Pré-sangria	6,7 (0,8)[4]	6/6/6
1	5,2 (0,7)[4]	6/6/6
2	5,3 (0,6)[4]	6/6/6
Coelho		
NRS	5,8 (0,6)[4]	8/8/8
BPV-1	3,5 (0,2)[5,6]	0/10/10
BPV-2	3,3 (0,5)[5,6]	1/6/6
BPV-1 (SDS)	8,3 (0,5)[4,5]	4/4/4
MAb		
13D6	4,4 (0,6)[4]	6/6/6
JG	5,3 (0,7)[4]	6/6/6
Bois castrados hiper-imunes		
926	3,0 (0,6)[5]	0/3/4
921	3,4 (0,4)[5]	0/6/6
Humano		
1	6,5 (0,7)[4]	6/6/6
2	5,0 (0,4)[4]	6/6/6

[1]Amostras de soro de várias fontes descritas ma Tabela I. –[2]As dimensões dos quistos foram determinadas a partir das médias geométricas dos diâmetros. –[3]Número de quistos morfologicamente transformados/número de quistos sobreviventes /número de enxertos tentados. –[4]Dimensão média dos quistos significativamente diferente ($p<0,05$) do grupo de tratamento infectado com BPV-1 de (controlo positivo para neutralização). –[5]Dimensão média dos quistos significativamente diferente ($p<0,05$) de anti-BPV-1 intacto de coelho (previamente utilizado como controlo positivo para estudos de neutralização de xenoenxertos de BPV-1). –[6]Dimensão média dos quistos significativamente diferente ($p<0,05$) de soro normal de coelho (previamente utilizado como controlo negativo para estudos de neutralização de xenoenxertos de BPV-1).

TABELA III

NEUTRALIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR BPV-1 DE CÉLULAS C127, POR SOROS BOVINOS, DE COELHO E HUMANOS E MAb MURINOS

Amostras de soro ou MAb[1]	Título de neutralização[2]
Vitelos vacinados	
163	
Pré-sangria	0
1	0
2	$<10^1$
173	
Pré-sangria	0
1	0
2	$<10^1$
Coelho	
NRS	0
BPV-1	10^6
BPV-2	10^2
BPV-1 (SDS)	0
MAb	
13D6	0
JG	0
Bois castrados hiper-imunes	
926	$>10^6$
921	$>10^3$
Humano	
1	0
2	0

[1]Identificação de diferentes soros e MAb como na Tabela I. -[2]O título de neutralização é expresso como o recíproco da diluição de soro mais elevada necessária para neutralizar a formação de focos de células C127 murinas por viriões de BPV-1.

DISCUSSÃO

O sistema de xenoenxerto proporcionou um modelo eficaz para a detecção de neutralização mediada por anticorpos de infecções por PV produtivas, incluindo BPV-1 (Christensen, N. e Kreider, J.W., "Antibody-mediated neutralization *in vitro* of infectious papillomaviruses", J. Virol. 64:3151-3156 (1990)). Contudo, os anticorpos neutralizantes evitaram também que os viriões de BPV-1 induzissem FF em células C127 murinas não

infectadas produtivamente em cultura (Dvoretzky, I., Shober, R., Chattopadhy, S.K. e Lowy, D.R., "A quantitative *in vitro* focus-forming assay for bovine papillomavirus", Virology 103:369-375 (1980)). Para comparar a especificidade dos 2 métodos, e para determinar os epítopos responsáveis pela neutralização, testaram-se soros seleccionados de gado vacum, coelhos e seres humanos e MAb murinos, quanto a actividade neutralizante.

Os genomas de papilomavírus são encapsidados por proteínas L1 (principal da cápside) e L2 (minoritária da cápside) (Banks, L. Matlashewski, G. Pim, D., Churcher, M., Roberts, C. e Crawford, L., "Expression of human papillomavirus type-6 and type-15 capsid proteins in bacteria and their antigenic characterization", J. Gen. Virol. 69:3081-3089 (1987), Christensen, N. Kreider, J.W., Cladel, N.M. e Galloway, D.A., "Immunologic cross-reactivity to laboratory-produced HPV-11 virions of polysera raised against bacterially derived fusion proteins and synthetic peptides of HPV-6b e HPV-16 capsid proteins", Virology 175:1-9 (1990), Cowsert, L.M., Lake, P. e Jenson, A.B., "Topographical and conformacional epitopes of bovine papillomavirus type 1 defined by monoclonal antibodies", J. Nat. Cancer Inst. 79:1053-1057 (1987), Cowsert, L.M., Pilacinski, W.P. e Jenson, A.B., "Identification of the bovine papillomavirus L1 gene product using monoclonal antibodies", Virology 165:613-615 (1988), Doobar, J. e Gallimore, P.H., "Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a", J. Virol. 61:2793-2799 (1987), Jin. X.W., Cowsert, L., Pilacinski, W. e Jenson, A.B., "Identification of L2 open reading frame gene products of bovine papillomavirus type-1 by monoclonal antibodies", J. Gen. Virol. 70:1133-1140 (1989), Komly, C.A., Breitburd, F., Croissant, O. e Streeck, R.E., "The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens", J. Virol. 60:813,816 (1986), Kreider, J.W., Howett, M.K., Wolfe, S.A., Barlett, G.L., Zaino, R.J., Sedlacek, T.V. e Mortel, R., "Morphological transformation *in vitro* of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata", Nature (Lond.) 317:639-640 (1985), Nakai, Y., Lancaster, W.D., Lim, L.Y. e Jenson, A.B., "Monoclonal antibodies to genus- and type-specific

papillomavirus structural antigens", Intervirology 25:30-37 (1986), Roseto, A., Pothier, P., Guillemin, M.C., Peries, J., Breitburd, F., Bonneaud, N. e Orth, G., "Monoclonal antibody to the major capsid protein of human papillomavirus type 1", J. Gen. Virol. 65:1319-1324 (1984)), para formar viriões nos núcleos de queratinócitos em diferenciação terminal (Firzlaff, J.M., Kiviat, N.B., Beckmann, A.M., Jenison, A. e Galloway, D.A., "Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 e L2 open reading frames", Virology 164:467-477 (1988), Jenson, A.B., Rosenthal, J.D., Olson, C, Pass, F.W., Lancaster, W.D. e Shah, K., "Immunologic relatedness of papillomavirus from different species", J. Nat. Cancer Inst. 64:495-500 (1980), Lim, P.S., Jenson, A.B., Cowsert, L., Nakai, Y., Lim, L.Y. e Sundberg, J., "Distribution and specific identification of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides", J. Infect. Dis. 162:1263-1269 (1990), Sandberg, J.P., Junge, R.E. e Lancaster, W.D., "Immunoperoxidase localization of papillomaviruses in hyperplastic and neoplastic epithelial lesions of animals", Amer. J. Vet. Res. 45:1441-1446 (1984). A proteína da cápside L1 de PV ao contrário da proteína L2, é altamente conservada em todo o género dos PV (Baker, C.C., "Sequence analysis of papillomavirus genomes", em: N.P. Salzman e P.M. Howley (eds.), The papoviridae, Vol. 2, The papillomavirus, pp. 321-385, Plenum, New York (1987). Contudo, apenas epítopos lineares e conformacionais específicos do tipo e minimamente reactivos cruzadamente da proteína L1 foram detectados na superfície de viriões por MAb, Cowsert, L.M., Lake, P. e Jenson, A.B., "Topographical and conformacional epitopes of bovine papillomavirus type 1 defined by monoclonal antibodies", J. Nat. Cancer Inst. 79:1053-1057 (1987), Cowsert, L.M., Pilacinski, W.P. e Jenson, A.B., "Identification of the bovine papillomavirus L1 gene product using monoclonal antibodies", Virology 165:613-615 (1988) enquanto epítopos lineares específicos do tipo da proteína L2 parecem ser internos à cápside (Jin. X.W., Cowsert, L., Pilacinski, W. e Jenson, A.B., "Identification of L2 open reading frame gene products of bovine papillomavirus type-1 by monoclonal antibodies", J. Gen. Virol. 70:1133-1140 (1989), Komly, C.A., Breitburd, F., Croissant, O. e Streeck, R.E.,

"The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens", J. Virol. 60:813,816 (1986), Tomita, Y., Shirasawa, H., Sekine, H. e Simizu, B., "Expression of human papillomavirus type 6b L2 open reading frame in Escherichia coli::L2-β-galactosidase fusion proteins and their antigenic properties", Virology 158:8-14 (1987)). Neste estudo, apenas soros de coelhos imunizados com viriões de BPV-1 ou BPV-2 intactos e de gado vacum infectado com homogenatos de fibropapilomas infectados produtivamente foram capazes de neutralizar a infecciosidade do BPV-1 tanto em células C127 murinas como nos xenoenxertos.

Embora o ensaio de neutralização em células D127 murinas possa ser mais quantitativo, principalmente porque o ensaio envolve FF de células individuais numa monocamada, não é mais específico do que o sistema do xenoenxerto (Christensen, N. e Kreider, J.W., "Antibody-mediated neutralization *in vitro* of infectious papillomaviruses", J. Virol. 64:3151-3156 (1990)), que é mais análogo à neutralização da infecção por BPV-1 no hospedeiro natural por vacinação prévia com viriões intactos (Jarrett, W.F.H., O'Neill, B.W., Gaukroger, J.M., Laird, H.M., Smith, K.T. e Campo, M.S., "Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus, tumour extract and transformed cells in prophylactic vaccination", Vet. Rec. 126:449-452 (1990a), Jarrett, W.F.H., O'Neill, B.W., Gaukroger, J.M., Laird, H.M., Smith, K.T. e Campo, M.S., "Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types", *Vet. Rec.* 126:473-475 (1990b)). Soros bovinos de vitelos vacinados quase 2 meses depois da provocação com viriões de BPV-1 neutralizaram FF induzidos por BPV-1 de células C127, mas não evitaram o desenvolvimento de fibropapilomas nos xenoenxertos. Embora ambos os ensaios fossem realizados utilizando alíquotas dos mesmos soros, as diferenças no pessoal, manuseamento dos espécimes, condições de infecção e neutralização, que foram realizados em localizações separadas, podiam também explicar a ligeira diferença de resultados.

Soros de coelho e bovino que foram preparados contra vacina de cápsides de BPV-1 desnaturadas ou L1 de BPV-1

recombinante, respectivamente, não neutralizaram a infecciosidade de BPV-1 em nenhum ensaio de neutralização. Como estes soros apenas reconheceram epítopos de L1 de BPV-1 contínuos, concluiu-se que os epítopos da superfície de BPV-1 linearizados não eram capazes de induzir anticorpos neutralizantes. A actividade neutralizante neste estudo parece ser largamente dependente dos epítopos conformacionais.

Os 2 soros humanos que reagiram com partículas de BPV-1 intactas não evitaram FF induzidos por BPV-1 em células C127 ou a transformação de pele bovina fetal no modelo de xenoenxerto. Isto sugere que os soros humanos ou reconheciam um mimeotopo não neutralizante ou definiam epítopos conformacionais de BPV-1 que não estão associados com a neutralização da infecciosidade de BPV-1. Apesar disso, estes resultados suportam o conceito de que é necessária uma exposição significativa a partículas virais de BPV-1 intactas para a produção de anticorpos neutralizantes (Jarrett, W.F.H., O'Neill, B.W., Gaukroger, J.M., Laird, H.M., Smith, K.T. e Campo, M.S., “Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus, tumour extract and transformed cells in prophylactic vaccination”, *Vet. Rec.* 126:449-452 (1990a), Jarrett, W.F.H., O'Neill, B.W., Gaukroger, J.M., Laird, H.M., Smith, K.T. e Campo, M.S., “Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types”, *Vet. Rec*. 126:473-475 (1990b)).

O nosso estudo revela que a neutralização da infecciosidade de BPV-1 por anticorpos séricos pode ser medida pela prevenção de FF em células C127 ou pela transformação de pele bovina fetal no modelo do xenoenxerto. Como os resultados dos 2 ensaios eram concordantes, conclui-se que (1) a neutralização de FF de células C127 e a transformação de pele bovina fetal nos xenoenxertos parecem ambas ser verdadeiros indicadores da capacidade de anticorpos para neutralizar a infecciosidade de BPV-1, ou seja, os anticorpos reagem com proteína L1 conformacionalmente correcta; e (2) a neutralização de FF por células C127 pode ser utilizada para estudos de interacção precoce virião de BPV-1-célula hospedeira para definir epítopos funcionais.

Exemplo 2
Expressão de um protótipo de proteína L1 (HPV-1) pelo vector pSVL transfectado em células COS

A proteína L1 de HPV-1 foi expressa porque existem vários anticorpos monoclonais contra HPV-1 que reagem com epítopos conformacionais presentes no virião intacto. Considerámos que se tivéssemos sucesso a gerar proteína L1 de HPV-1 com a conformação nativa, esses anticorpos monoclonais poderiam reagir com a proteína L1 expressa, isolada. Isto confirmaria a capacidade de produzir proteína L1 com a conformação adequada para imitar a que está presente na partícula de vírus intacta. Para produzir um anticorpo neutralizante, é crítico para gerar uma resposta imunitária contra os epítopos conformacionais do papilomavírus.

A escolha do vector baseou-se em vários critérios. Pretendíamos ter vectores de expressão que produzissem elevados níveis de proteína da cápside, o que não apenas facilitaria a sua utilização para vacinas como também auxiliaria potencialmente o atingir de formação de cápside vazia no núcleo. O vector pSVL e os vectores de baculovírus utilizam ambos promotores muito fortes e têm sido extensamente utilizados para a expressão de proteínas. Em adição, o vector pSVL contém uma origem de replicação de SV40 e, quando transfectado em células COS que expressam o antigénio T Grande, replica até um elevado número de cópias. A replicação do vector inicial, combinada com a forte actividade do promotor viral, resultam em níveis extremamente elevados de proteína expressa. As células COS são também permissivas à montagem de viriões de SV40 e podem potencialmente facilitar a montagem de partículas de PV. O sistema de baculovírus também oferece a vantagem de que maiores percentagens de células podem ser induzidas a expressar proteína (devido à utilização de técnicas de infecção em vez de transfecção). Embora o baculovírus seja um vírus de insectos e cresça em células de insecto (Sf9), estas células retêm muitos dos mecanismos eucariotas de processamento de proteínas (glicosilação e fosforilação) que podem ser importantes para gerar proteínas com a conformação apropriada.

O esquema para a clonagem da proteína L1 de HPV-1 em pSVL é apresentado na Fig. 1.

A expressão da proteína L1 de HPV-1 por pSVL foi primeiro ensaiada por imunofluorescência. Células COS foram transfectadas com 1-10 ug do plasmídeo apresentado na Fig. 1. Após 48 h, as células foram fixas com metanol frio e depois feitas reagir com ascites de ratinho não imune (a), anti-soro de coelho gerado contra BPV-1 fragmentado por SDS (b), ou anticorpo monoclonal de ratinho 405D5 que reconhece um epítopo conformacional específico do tipo no HPV-1. Observou-se uma coloração nuclear positiva com ambos os anticorpos que estava ausente em células não transfectadas. Em adição, as células que expressam L1 foram também reactivas com vários anticorpos monoclonais adicionais que reagem especificamente com epítopos conformacionais independentes (resultados não apresentados). Após a transfecção fixaram-se então as células COS com metanol e coraram-se quanto a reactividade com soro de coelho de controlo, anti-soro Dako gerado contra viriões de BPV-1 fragmentados por SDS, ou anticorpo monoclonal de ratinho 405D5 que reage especificamente com epítopos conformacionais de viriões de HPV-1. Quatro anticorpos monoclonais específicos da conformação adicionais originaram um padrão de imunofluorescência idêntico e indicaram claramente que a proteína L1 sintetizada em células COS retém epítopos conformacionais. Em adição, a proteína L1 exibe a localização intranuclear antecipada, reflectindo os correctos processamento e translocalização desta proteína. Este resultado demonstra que o epítopo conformacional identificado pelo anticorpo 405D está presente inteiramente na proteína L1 (e não na L2 ou numa combinação de L1/L2). Mais importante, a reactividade de L1 com este anticorpo monoclonal demonstra que a proteína L1 retinha um epítopo conformacional idêntico ao encontrado no seu estado associado ao virião. Experiências de microscopia electrónica estão presentemente a ser realizadas para avaliar se a proteína L1 está montada em partículas virais vazias. Assim, o vector pSVL é bem sucedido na produção de proteína L1 de HPV-1 com uma conformação nativa para gerar respostas de anticorpos que reagem com partículas de vírus intactas.

A síntese da proteína L1 foi também determinada por imunoprecipitação a partir de células COS transfectadas. A 48 h após a transfecção, as células COS foram metabolicamente marcadas com S-35 metionina e cisteína durante 4 h, extractadas com tampão RIPA e imunoprecipitadas com anti-soro de coelho gerado contra BPV-1 fragmentado por SDS (Dako). Utilizámos este anticorpo para as imunoprecipitações pois a solubilização de proteína L1 com detergentes desnaturantes pode eliminar o seu reconhecimento pelo anticorpo de L1 dependente da conformação atrás descrito. Uma SDS-PAGE do imunoprecipitado indica que a proteína L1 sintetizada tem o comprimento completo (55 kD). Esta série de experiências de imunofluorescência e imunoprecipitação demonstra portanto que o vector pSVL será capaz de gerar proteína L1 que será adequada para a indução de anticorpos dependentes da conformação.

Exemplo 3

As infecções por papilomavírus provocam verrugas cutâneas e das mucosas genitais (*condylomata*) numa ampla variedade de animais vertebrados (Olson, C, em "The papovaviridae" (N.P. Salzman e P.M. Howley, Eds.), pp. 39-66, Plenum Press (1987)) e, nos seres humanos, estão fortemente associadas ao desenvolvimento de displasia e carcinoma cervicais (Jenson, A.B., e Lancaster, W.D., em "Papillomaviruses and human cancer" (H. Pfister, Ed.) pp. 11-43, CRC Press (1990)). Cada tipo de papilomavírus é altamente específico da espécie e infecta preferencialmente epitélio escamoso num número restrito de localizações anatómicas. A replicação vegetativa de ADN viral ocorre no núcleo de queratinócitos terminalmente diferenciados onde o genoma viral fica encapsidado pelas proteínas da cápside principal (L1) e minoritária (L2), formando viriões com 55 nm de diâmetro. Infelizmente, não existem sistemas de cultura de tecidos que permitam suficiente diferenciação de queratinócitos para propagar os papilomavírus *in vitro* e esta limitação tem comprometido a análise da expressão tardia dos genes de L1 e L2 assim como a caracterização da resposta imunitária do hospedeiro aos seus produtos génicos.

Devido ao papel etiológico que os papilomavírus humanos (HPV) desempenham em algumas malignidades humanas, recentemente a atenção tem-se focado no desenvolvimento de uma vacina de proteína da cápside recombinante para reduzir a incidência da infecção por HPV e suas sequelas neoplásicas. O primeiro modelo animal para uma potencial vacina utilizou papilomavírus do tipo 1 (BPV-1) bovino. A proteína L1 de BPV-1 foi expressa em bactérias (Pilacinski, W.P., Glassmam, D.L., Krzyzek, R.A., Sadowski, P.L., e Robbins, A.K., Biotechnology 2:356-360 (1984)) e utilizada para imunizar gado vacum contra uma subsequente provocação viral (Pilacinski, W.P., Glassmam, D.L., Glassman, K.L., Read, D.E., Lum, M.A., Marshall, R.F., e Muscoplat, C.C., em "Papillomaviruses: molecular and clinical aspects" (T.R. Broker e P.M. Howley, Eds., pp. 257-271, Alan R. Liss, Inc., New York (1985)). Contudo, como a proteína L1 expressa aparentemente não tinha a conformação nativa (devido à forma de agregados, insolúvel, de proteínas de fusão sobre-expressas em bactérias), não induziu anticorpos que poderiam reconhecer ou neutralizar viriões de BPV-1 intactos (Jin, X.W., Cowsert, L., Marshall, D., Reed, D., Pilacinski, W., Lim, L.Y., e Jenson, A.B., Intervirology 31:345-354 (1990); e Ghim, S., Christensen, N.D., Kreider, J.W., e Jenson, A.B., Int. J. Cancer 49:285-289 (1991)).

A capacidade de anticorpos para neutralizar papilomavírus parece estar relacionada com a sua capacidade de reagir com epítopos conformacionais, específicos do tipo, na superfície do virião (Ghim, S., Christensen, N.D., Kreider, J.W., e Jenson, A.B., Int. J. Cancer 49:285-289 (1991); Christensen, N.D. e Kreider, J.W., J. Virol. 64:3151-3165 (1990); Christensen, N.D., Kreider, J.W., Cladel, N.M., Patrick, S.D., e Welsh, P.A., J. Virol. 64:5678-5681 (1990); e Jarrett, W.F.H., O'neil, B.W., Gaukroger, J.M., Smith, K.T., Laird, H.M., e Campo, M.S., Vet. Rec. 126:437-475 (1990)) e, de facto, estudos anteriores demonstraram que a resposta predominante de anticorpos detectada contra HPV-1 em seres humanos é dirigida contra estes epítopos conformacionais (Steele, J.C., e Gallimore, P.H., Virology 174:388-398 (1990); e Anisimová, E., Barák, P., Vlcek, D., Hirsch, I., Brichácek, B., e Vonka, V., J. Gen. Virol. 71:419-422 (1990)). No presente estudo, caracterizamos uma série de anticorpos quanto à sua reactividade com epítopos conformacionais de HPV-1 e

demonstramos que a proteína L1 de HPV-1 sintetizada em células COS expressa estes epítopos conformacionais de viriões. Esta proteína expressa pode, portanto, ser utilizada para o desenvolvimento de vacinas assim como técnicas de rastreio serológico.

As experiências iniciais foram desenhadas para caracterizar uma série de anticorpos policlonais e monoclonais quanto à sua reactividade com viriões de HPV-1 que estavam num estado intacto (conformação nativa) ou desnaturado por SDS (não conformacional). Era essencial caracterizar estes anticorpos com detalhes de modo a que pudessem ser utilizados para avaliar o estado conformacional de proteína L1 de HPV-1 expressa. Um resumo das experiências ELISA e dos detalhes para o isolamento e purificação dos viriões de HPV-1 é dado na Tabela IV.

Resumidamente, poços de placas de microtítulo foram revestidos com viriões de HPV-1 intactos ou fragmentados por SDS como descrito anteriormente (Cowsert, L.M., Lake, P., e Jenson, A.B., J. Natl. Cancer Inst. 79:1053-1057 (1987)) e utilizados para o rastreio dos anti-soros ou anticorpos monoclonais indicados. Os dois soros de coelho hiper-imune produzidos contra HPV-1 foram anteriormente descritos (Pass, F., e Maizel, J.V., J. Invest. Dermatol. 60:307-311 (1973)); o anti-soro de coelho (R#3) foi gerado contra partículas de HPV-1 fragmentadas e o anti-soro de coelho (R#7) contra partículas intactas. Os quatro anticorpos monoclonais que reconhecem epítopos conformacionais na superfície de partículas de HPV-1 foram gentilmente fornecidos por Dr. P. Pothier (Bourgogn University, França).

TABELA IV

Reactividade de anti-soros policlonais de coelho e anticorpos monoclonais murinos com viriões[a] de HPV1 intactos e fragmentados, determinada por ELISA.

Anticorpo		Imunogénio	Valor de ELISA	
			Viriões intactos	Viriões fragmentados
Coelho	Pass. 7	HPV1 intacto	1,493	0,002
	Pass. 3	HPV1 fragmentado	0,918	0,616
Murino	334B6	HPV1 intacto	0,438	0,003
	339B6	HPV1 intacto	0,520	0,000
	405D5	HPV1 intacto	0,429	0,009
	D54 G10	HPV1 intacto	0,464	0,003
	MAB45[b]	L1 de HPV1	0,512	0,332

[a]Os viriões de HPV-1 foram extraídos de verrugas plantares produtivamente infectadas (Jenson, A.B., Lim, L.Y., e Singer, E., J. Cutan. Pathol. 16:54-59 (1989)) e purificados por centrifugação de equilíbrio num gradiente de CsCl (Cowsert, L.M., Lake, P., e Jenson, A.B., J. Natl. Cancer Inst. 79:1053-1057 (1987)). Viriões (1,34 g/ml) e partículas vazias (1,29 g/ml) foram recolhidas separadamente, dialisados contra tampão Tris (Tris 20 mM, PMSF 10 mM, pH 7,5) e armazenados a -70°C. Poços de placas de microtítulo (Immunolon II, Dynatech) foram revestidos com viriões de HPV-1 intactos ou fragmentados por SDS como previamente descrito (Cowsert, L.M., Lake, P., e Jenson, A.B., J. Natl. Cancer Inst. 79:1053-1057 (1987)). As placas foram então lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST). Os poços de microtítulo foram adicionalmente incubados com PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (PBSA) durante 1 h a 37°C para evitar a ligação não específica de proteína. As placas foram lavadas novamente com PBST e incubadas primeiro com os anticorpos policlonais de coelho ou os anticorpos monoclonais murinos, como anticorpo primário, e subsequentemente com o anti-IgG de cabra apropriado conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:1000 em PBSA (Bio-Rad) durante 1 h a 37°C. Após várias lavagens, as placas de microtítulo foram reveladas com substrato de fosfatase SIGMA 104 (Sigma) em tampão de dietanolamina (Voller, A., Bidwell, D., e Bartlett, A., em "Manual of clinical immunology" (N. Rose e H. Freedman, Eds.), pp. 359-371. American Society of Microbiology, Washington, DC (1980)) durante 30 min a 37°C. A absorvância foi medida a 410 nm utilizando um leitor Dynatech Micro-elisa.

[b]MAB45 é uma designação abreviada de MABDW45 (Yaegashi, N., Jenison, S.A., Valentine, J.M., Dunn, M., Taichman, L.B., Baker, D.A., e Galloway, D.A., J. Virol. 65:1578-1583 (1991)).

O anticorpo monoclonal (MAB45) define um epítopo linear na superfície do virião de HPV-1 (Yaegashi, N., Jenison, S.A., Valentine, J.M., Dunn, M., Taichman, L.B., Baker, D.A., e Galloway, D.A., J. Virol. 65:1578-1583 (1991)) e foi obtido através da generosidade do Dr. D.A. Baker (State University of New York, Stony Brook). Os resultados de ELISA indicam que o anti-soro R#7 é de facto específico para epítopos conformacionais na superfície do virião de HPV-1 pois reage apenas com viriões de HPV-1 intactos. Isto é igualmente verdadeiro para os anticorpos monoclonais 334B6, 339B6, 405D5, e D54G10. Por outro lado, o anti-soro R#3 e o MAB45 monoclonal também reagem bem com viriões desnaturados por SDS, demonstrando a sua reactividade com epítopos não conformacionais, lineares (Cowsert, L.M., Lake, P., e Jenson, A.B., J. Natl. Cancer Inst. 79:1053- 1057 (1987)).

Para confirmar os resultados de ELISA apresentados na Tabela IV, avaliámos também os mesmos anticorpos quanto a reactividade com viriões de HPV-1 fragmentados, determinada por *Western blotting* (Figura 1). Esta figura demonstra que apenas os anticorpos que reconheceram viriões de HPV-1 desnaturados por ELISA (R#3 e MAB45) apresentaram reactividade significativa com proteínas de viriões desnaturados por SDS por imunotransferência. Contudo, os anticorpos apresentados na Tabela IV que reconhecem apenas viriões intactos (R#7, 334B6, 339B6, D54G10, e 405D5) não exibiram, ou exibiram pouca, reactividade por análise de imunotransferência. Assim, duas técnicas independentes verificam a especificidade dos anticorpos anteriores para epítopos conformacionais e não conformacionais no virião de HPV-1.

Numa tentativa de produzir proteína L1 isolada que retinha epítopos de conformação de viriões críticos, expressámos a proteína L1 de HPV-1 em células de mamífero. O gene de L1 de HPV foi amplificado por PCR e clonado no vector pSVL como descrito na Figura 2 utilizando técnicas moleculares padrão (Maniatis, T., Fritsch, E.F., e Sambrook, J., em "Molecular cloning: A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)). O plasmídeo resultante, pSJ1-L1, expressa o gene de L1 de HPV-1 a partir de um promotor tardio de SV40 forte. Em adição, o plasmídeo contém também a origem de replicação de SV40 e, quando transfectado em células COS por precipitação com fosfato de cálcio (Graham, F.L., e van der Eb, A.J., Virology 52:456-467 (1973)), replica até um elevado número de cópias.

As células COS foram primeiro avaliadas quanto a síntese de proteína L1 por técnicas de imunoprecipitação utilizando os anticorpos anteriores. A 48 h após a transfecção, as células COS foram marcadas com ^{35}S-metionina (NEN, Mistura de marcação de Proteínas com ^{35}S Expressa) durante 4 h, lavadas com tampão, e solubilizadas em tampão RIPA (que contém uma mistura de NP-40 a 1%, DOC e detergentes SDS a 0,1%). Os extractos celulares foram então imunoprecipitados com os anticorpos indicados e analisados por electroforese em gel com SDS como previamente descrito (Goldstein, D.J., e Schlegel, R., EMBO 9:137-146 (1990)). Os resultados na Figura 3 indicam que a proteína L1 podia ser eficientemente precipitada por anticorpos dependentes da conformação (tais como R#7, 334B6, 339B6, D54G10 e 405D5). Em adição, a proteína L1 podia também ser imunoprecipitada com anticorpos que reconhecem epítopos não conformacionais sobre a superfície dos viriões (R#3). Estas constatações indicam que a proteína L1 expressa em células COS apresentava epítopos conformacionais observados previamente apenas em viriões intactos. É igualmente óbvio que as condições de extracção da L1 não desnaturam significativamente a proteína. Característico da proteína L1 isolada directamente de viriões, a proteína L1 sintetizada tinha aproximadamente 57 kD de comprimento (Doorbar, J., e Gallimore, P.H. J. Virol. 61:2793-2799 (1987)). A retenção de epítopos conformacionais em tampão RIPA e a capacidade de anticorpos dependentes da conformação reagirem com L1 indicam que será possível a purificação por afinidade da proteína L1 a partir de células transfectadas.

As células COS foram também avaliadas quanto à síntese de proteína L1 por microscopia de imunofluorescência (Figura 4). As células, plaqueadas em lamelas de vidro em meio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro de vitelo fetal a 10%, foram transfectadas com 10 µg de ADN plasmídico, submetidas a um choque de glicerol 48 h mais tarde, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), e fixadas durante 5 min em acetona fria. As células foram então feitas reagir com diluições apropriadas de anticorpo primário seguido de IgG de cabra anti-coelho ou de cabra anti-ratinho conjugado com fluoresceína. As incubações com anticorpos primários e secundários foram realizadas à temperatura ambiente durante 1 h. Subsequentemente a uma lavagem final com PBS, montaram-se as lamelas em Elvanol e observaram-se num microscópio de fluorescência Olympus. A presença de proteína L1 em núcleos

celulares foi claramente discernível em 5-10% das células transfectadas 48 horas após a transfecção, independentemente do facto do anticorpo primário reagir com epítopos conformacionais e/ou não conformacionais. Todos os anticorpos que foram capazes de imunoprecipitar a L1 foram também bem sucedidos na imunofluorescência. Tal como previamente mencionado, os anticorpos produzidos contra viriões fragmentados reconhecem tanto epítopos lineares de viriões internos como externos e portanto são capazes de reagir com partículas intactas (*e.g.*, R#3). Contudo, estes anticorpos não reconhecem epítopos conformacionais e não são neutralizantes (Ghim, S., Christensen, N.D., Kreider, J.W., e Jenson, A.B., Int. J. Cancer 49:285-289 (1991)). Assim, o padrão de coloração obtido com anti-soros de coelho contra viriões de HPV-1 nativos (R#7) ou desnaturados (R#3) foi indistinguível. Estes resultados demonstram portanto, inequivocamente, que a proteína L1 sintetizada nas células COS tinha uma conformação similar à encontrada nos viriões intactos. Em adição, a proteína claramente translocou-se para o núcleo de uma maneira normal (Zhou, J., Doorbar, J., Sun, X.Y., Crawford, L.V., McLean, C.S., e Franzer, I.H., Virology 185:625-632 (1991)).

As constatações anteriores sugerem que a proteína principal da cápside de HPV-1, quando expressa na ausência de outras proteínas virais, pode reproduzir/imitar precisamente a antigenicidade de partículas virais intactas. Embora não possamos ter a certeza de que não estavam presentes partículas virais montadas nas células COS transfectadas, não tivemos sucesso na visualização destas estruturas por exame em microscopia electrónica nem de células transfectadas nem de imunoprecipitados contendo proteína L1 (resultados não apresentados). Aparentemente, não é essencial haver formação de partículas virais para reproduzir os epítopos conformacionais virais característicos.

Como os locais de neutralização presentes em viriões de papilomavírus consistem predominantemente em epítopos conformacionais, está inferido nos nossos estudos que a proteína L1 sintetizada em células COS pode servir com sucesso como vacina ou para a detecção e tipagem serológicas de infecções por papilomavírus. Devido às semelhanças entre os papilomavírus em relação à organização genética, à estrutura dos viriões e à sequência de aminoácidos das suas proteínas da cápside, é também provável que as nossas constatações com a L1 de HPV-1 tenham aplicação directa no estudo de outros HPV tais

como HPV-16 e HPV-18 que possuem importantes papéis contributivos para o desenvolvimento do carcinoma cervical.

TABELA V

VALORES DE ELISA A 25 MIN EM SUBSTRATO

Quatro coelhos foram inoculados com homogenatos de células COS contendo L1 de BPV-1 intranuclear, conformacionalmente correcta. Cada um de 4 coelhos recebeu homogenatos de $1X10^6$ células em adjuvante completo de Freund no dia 0, e $1X10^6$ células em adjuvante incompleto de Freund nos dias 14 e 28, e foram depois sangrados no dia 38. Os soros pré-sangria dos 4 coelhos eram negativos quanto a reactividade com viriões de BPV-1 intactos e desnaturados, por ELISA. No dia 38, os coelhos #1 2, 3 e 4 foram testados quanto a reactividade com partículas de BPV-1 intactas e fragmentadas após 25 min. de incubação com substrato como mostrado na Tabela V.

TABELA V

	1:50	1:100	1:500	
1.	0,445	0,266	0,014	BPV-1 intacto (I)
	0,042	0,028	0,001	BPV-1 fragmentado (F)
	0,016	0,001	-0,002	Sol. salina tamponada com fosfato (PBS)
2.	0,332	0,210	0,011	(I)
	0,076	0,047	0,077	(F)
	0,025	0,018	0,001	(PBS)
3.	0,157	0,096	0,003	(I)
	0,027	0,016	-0,001	(F)
	0,022	0,011	-0,001	(PBS)
4.	0,275	0,159	0,011	(I)
	0,075	0,044	0,005	(F)
	0,017	0,011	0,001	(PBS)
*1H8	-	-	0,022	(I)
	-	-	0,880	(F)
	-	-	<0,020	(PBS)
**viriões de BPV-1 intactos de coelho	-	-	>2,000	(I)
	-	-	0,058	(F)
	-	-	<0,020	(PBS)

* o MAb 1H8 reconhece apenas BPV-1 fragmentado

** o Ab policlonal de coelho anti-BPV-1 intacto reconheceu apenas BPV-1 intacto

Lisboa, 2007/12/12

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína L1 de papilomavírus (PV) humano produzida recombinantemente, isolada, ou um seu fragmento, em que a referida proteína, ou o seu fragmento, proporcionam os epítopos conformacionais presentes em viriões de papilomavírus humano intactos, e reagem com anticorpos monoclonais que reagem com viriões de HPV intactos mas não reagem com viriões de HPV fragmentados, e em que a referida proteína, ou o seu fragmento, são capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra viriões de papilomavírus.

2. Proteína, ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 1, em que a referida proteína é proteína L1, ou um seu fragmento, de um papilomavírus humano seleccionado do grupo que consiste em HPV 1, 2, 3a, 4, 5, 6b, 7, 8, 9, 10, 11a, 12, 13, 16 e 18.

3. Proteína, ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 2, em que o referido HPV é 16 ou 18.

4. Proteína, ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 2, em que o referido HPV é 6b ou 11a.

5. Proteína, ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a referida proteína ou o seu fragmento são produzidos numa célula hospedeira eucariota.

6. Proteína, ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a referida proteína ou o seu fragmento são produzidos numa célula hospedeira de mamífero.

7. Proteína, ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a referida proteína ou o seu fragmento são produzidos num sistema de expressão de baculovírus.

8. Proteína, ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a referida proteína ou o seu fragmento são produzidos em células COS.

9. Vacina para a prevenção de infecção por papilomavírus, a referida vacina compreendendo pelo menos uma proteína L1 de papilomavírus (PV) humano produzida recombinantemente ou um seu fragmento, proteína ou seu fragmento esses que proporcionam os epítopos conformacionais presentes em viriões de papilomavírus humano intactos e reagem com anticorpos monoclonais que reagem com viriões de HPV intactos mas não reagem com viriões de HPV fragmentados, e em que a referida proteína ou o seu fragmento são capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra viriões de papilomavírus.

10. Vacina de acordo com a reivindicação 9, em que a referida proteína ou o seu fragmento são produzidos num sistema de expressão de baculovírus.

11. Vacina de acordo com a reivindicação 9 ou a reivindicação 10, compreendendo adicionalmente um transportador imunogénico.

12. Vacina de acordo com a reivindicação 11, em que o referido transportador é albumina sérica bovina ou hemocianina de lapa.

13. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, em que o referido PV é seleccionado entre HPV 1, 2, 3a, 4, 5, 6b, 7, 8, 9, 10, 11a, 12, 13, 16 e 18.

14. Vacina de acordo com a reivindicação 13, em que a referida vacina compreende proteína L1, ou um seu fragmento, de HPV-16.

15. Vacina de acordo com a reivindicação 13, em que a referida vacina compreende proteína L1, ou um seu fragmento, de HPV-18.

16. Vacina de acordo com a reivindicação 13, em que a referida vacina compreende proteína L1, ou um seu fragmento, de HPV-16 e HPV-18.

17. Vacina de acordo com a reivindicação 13, em que a referida vacina compreende proteína L1, ou um seu fragmento, de HPV-6b ou HPV-11a.

18. Método para produção da proteína recombinante ou o seu fragmento de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, compreendendo:

(a) a transformação de uma célula hospedeira que é capaz de expressar uma proteína L1 de papilomavírus ou um seu fragmento antigénico numa conformação equivalente às das proteínas L1 expressas na superfície de viriões de papilomavírus intactos; e

(b) a cultura da referida célula hospedeira sob condições adequadas para a expressão da referida proteína da cápside principal L1 ou seu fragmento antigénico.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o sistema de expressão compreende um vector de baculovírus.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que a célula hospedeira é uma célula hospedeira eucariota.

21. Método de acordo com a reivindicação 19, em que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

22. Método de acordo com a reivindicação 19, em que a célula hospedeira é uma célula COS.

Lisboa, 2007/12/12

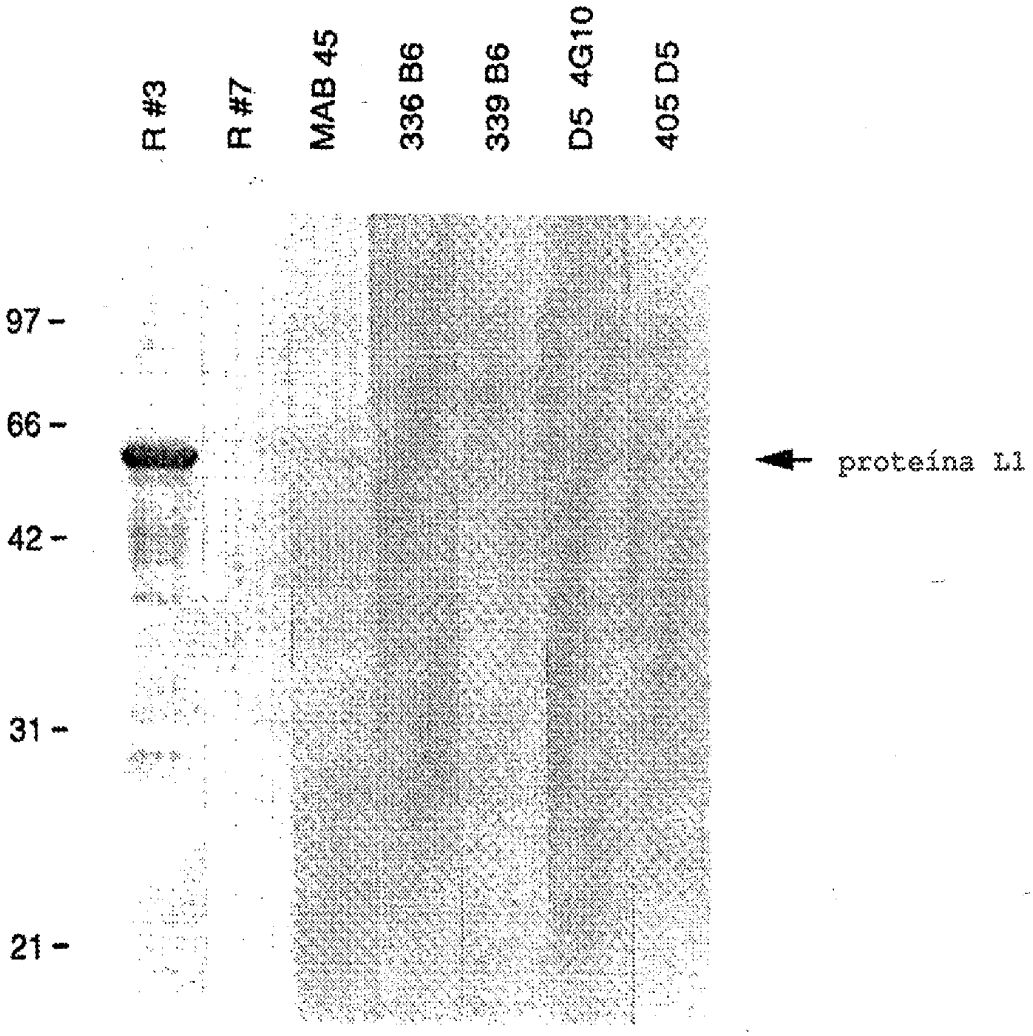

R #3
R #7
MAB 45
336 B6
339 B6
D5 4G10
405 D5
97 -
66 -
42 -
31 -
21 -
proteína L1

FIG. 1

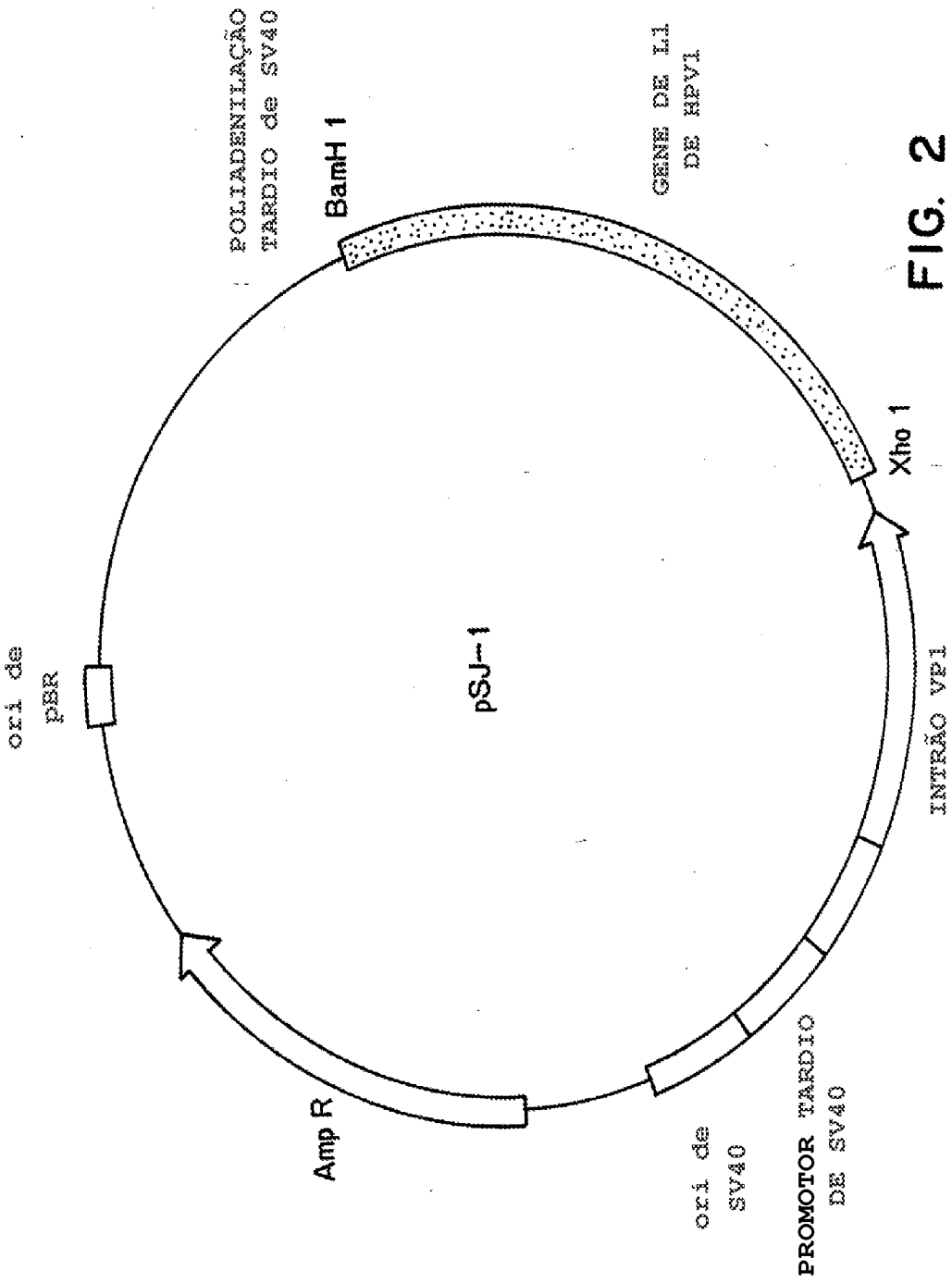

ori de
pBR
Amp R
ori de
SV40
PROMOTOR TARDIO
DE SV40
INTRÃO VP1
Xho 1
GENE DE L1
DE HPV1
BamH 1
POLIADENILAÇÃO
TARDIO de SV40
pSJ-1

FIG. 2

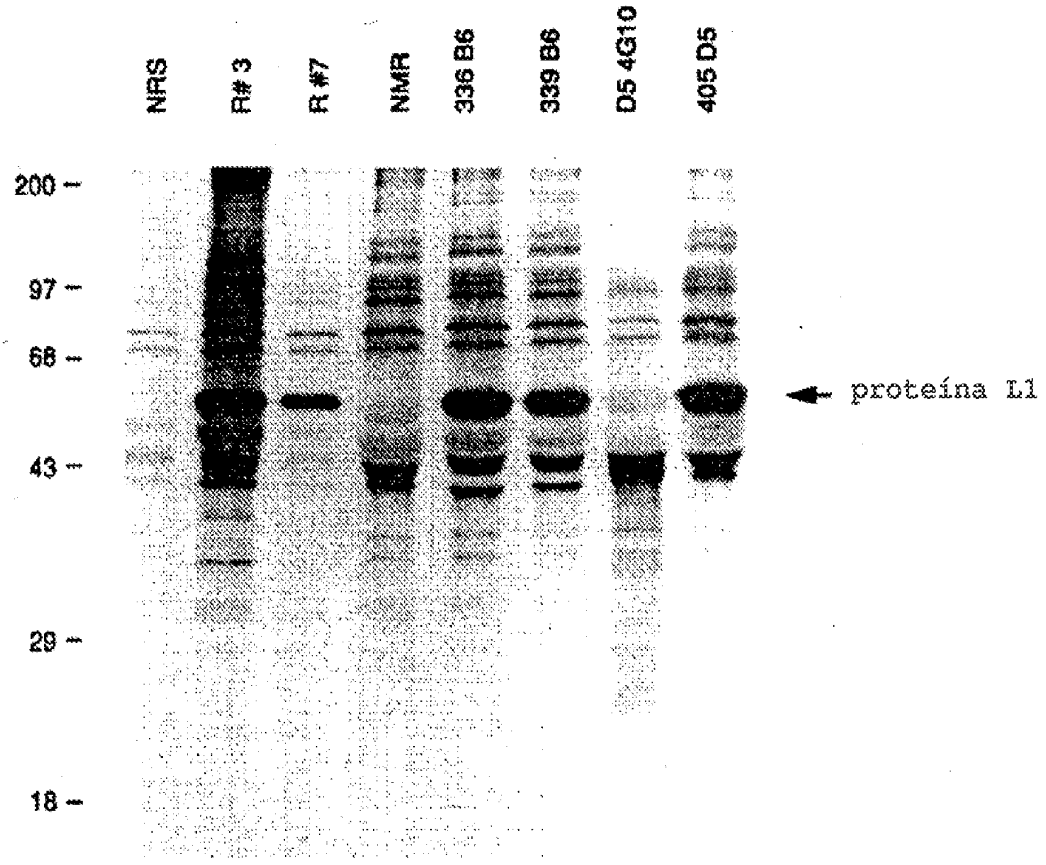

NRS
R# 3
R #7
NMR
336 B6
339 B6
D5 4G10
405 D5
200
97
68
43
29
18
proteína L1

FIG. 3

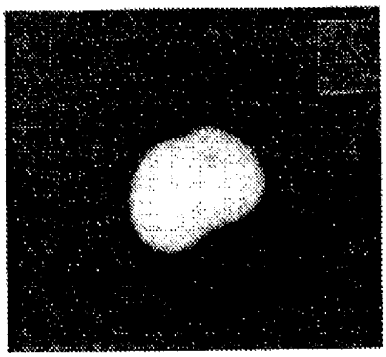


FIG. 4a

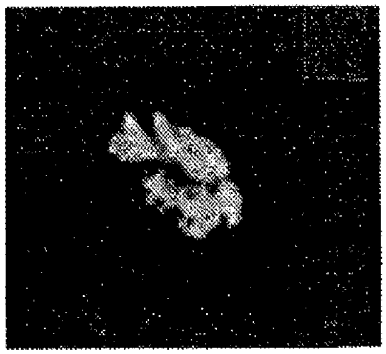


FIG. 4b

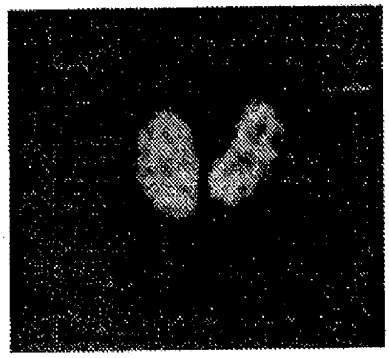


FIG. 4c

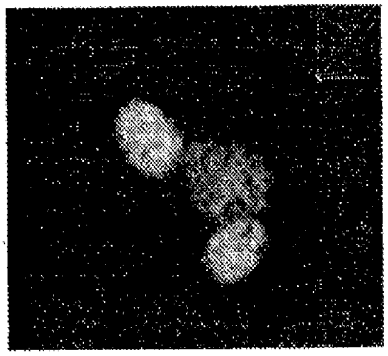


FIG. 4d

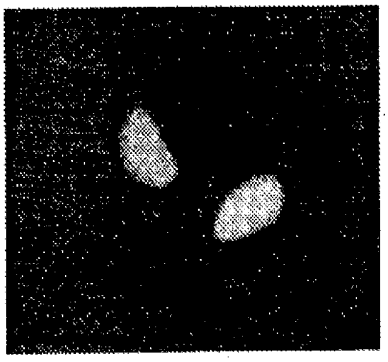


FIG. 4e

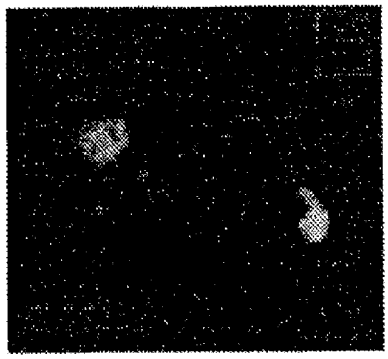


FIG. 4f

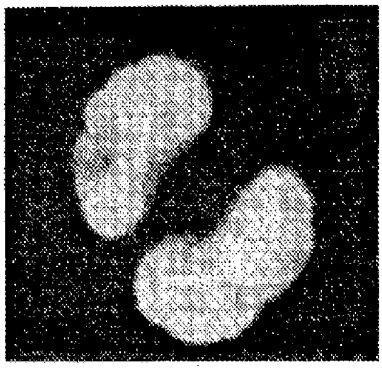


FIG. 4g

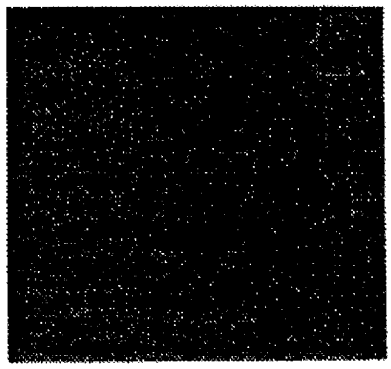


FIG. 4h