



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 376**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97952496 .4**
86 Fecha de presentación : **16.12.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0957936**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.1999**

54 Título: **Formulaciones de vacunas recombinantes frente a papilomavirus.**

30 Prioridad: **20.12.1996 US 33566 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **Merck & Co., Inc.**
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065, US

72 Inventor/es: **Gupta, Sunil, K. y**
Mark, George, E., III

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 273 376 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de vacunas recombinantes frente a papilomavirus.

5 **Campo de la invención**

Se proporcionan formulaciones vacunales que comprenden proteínas recombinantes tempranas (T) y tardías (T) de papilomavirus y manano oxidado así como procedimientos para fabricar y usar las formulaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

La presente invención identifica una nueva tecnología que puede ser útil para provocar respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células frente a un antígeno proteico candidato para el desarrollo de vacunas.

15 El hidróxido de aluminio normalmente provoca potentes respuestas de anticuerpos frente al antígeno candidato y pocas, si algunas, respuestas inmunitarias mediadas por células.

Apostolopoulos y col. demostraron la inducción de fuertes respuestas inmunitarias mediadas por células al antígeno mucina 1 (MUC 1) en ratones cuando los animales fueron inmunizados con el antígeno MUC1 conjugado con manano oxidado (oxo-manano). Estos estudios se describen en las siguientes referencias: i) Production of anti-peptide specific antibody in mice following immunization with peptides conjugated to mannan. Okawa. Y, Howard. C. R. y Steward. M. W. 1992, J immunol. Methods 149: 127-131. Department of clinical sciences, London School of Higiene and Tropical Medicine, London, RU; ii) Apostolopoulos, V., Pietersz. G. A., Loveland, B. E., Sandrin, M. S., y McKenzie, I. F. 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 10128-10132. The Austin Research Institute, Studly Road, Heidelberg 3084, Victoria, Australia; y iii) Apostolopoulos, V., Loveland, B. E., Pietersz G. A. y McKenzie. I. F. 1995, J Immunol. 155: 5089-5094. The Austin Research Institute, Studly Road, Heidelberg 3084, Victoria, Australia. Sin embargo, la utilidad de oxo-manano como adyuvante o inmunomodulador en el desarrollo de vacunas frente a agentes infecciosos no se ha evaluado.

30 Es probable que los antígenos conjugados con manano oxidado o reducido provoquen fuertes respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales frente al antígeno candidato. Se ha usado alumbre como adyuvante que provoca buenas respuestas inmunitarias humorales y pocas, si algunas, respuestas inmunitarias mediadas por células.

35 Sería útil desarrollar vacunas contra papilomavirus humano que puedan requerir un adyuvante capaz de provocar respuestas tanto humorales como mediadas por células frente a antígenos de papilomavirus. En este informe, los autores describen la utilidad del oxo-manano a la hora de provocar respuestas inmunitarias protectoras frente a agentes infecciosos en un modelo de papilomavirus de conejo de cola de algodón.

40 Los virus del papiloma humano (HPV) son virus sin cubierta, de ADN bicatenario, de los que se han identificado más de 75 tipos. La infección con HPV puede tener como resultado el desarrollo de condilomas genitales y neoplasia cervical, y puede asociarse con hasta un 90% de los carcinomas cervicales. Los virus del papiloma son especies específicas en relación con la infección productora y la infección por HPV en animales no produce la enfermedad. Esto necesita que se realicen las pruebas preliminares de vacunas candidatas en modelos de papilomavirus en animales. El papilomavirus del conejo de cola de algodón (CRPV) fue el primer papilomavirus identificado y también el primer virus de ADN asociado con el cáncer. L1 es el principal componente de la cápside del virus y la expresión de L1 en baculovirus o levaduras tiene como resultado la formación de partículas similares a virus (VLP). La inmunización de animales con VLP con la principal proteína de la cápside (L1) tiene como resultado la generación de anticuerpos neutralizantes que reconocen epítomos conformacionales formados cuando las proteínas de la cápside viral se ensamblan en VLP o viriones. Aunque la vacunación con VLP solo es eficaz contra la provocación mediante CRPV infeccioso, no tiene efectos en la contención de la infección preexistente.

50 En este estudio, los autores evaluaron la utilidad del manano oxidado como transportador para el desarrollo de la vacuna e inmunoterapia. Los autores han conjugado manano oxidado con antígenos de proteínas tempranas del CRPV (proteínas E) expresados en *E. coli* y evaluaron su eficacia en la contención de la infección preexistente.

55 Las infecciones por papilomavirus se producen en una variedad de animales, incluidos seres humanos, ovejas, perros, gatos, conejos, monos, serpientes y vacas. Los papilomavirus infectan células epiteliales, en general inducen tumores epiteliales o fibroepiteliales benignos en el punto de la infección. Los papilomavirus son agentes infecciosos específicos de especie; un papilomavirus humano no puede infectar a un animal no humano.

60 Los papilomavirus pueden clasificarse en grupos distintos según el huésped que infectan. Los papilomavirus humanos (HPV) se clasifican además en más de 70 tipos según la homología de la secuencia de ADN (para una revisión, véase Papillomaviruses and Human Cancer, H. Pfister (ed.), CRC Press, Inc., 1990). Los tipos de papilomavirus parecen ser inmunógenos específicos de tipo en cuanto a que una inmunidad neutralizante frente a la infección con un tipo de papilomavirus no confiere inmunidad contra otro tipo de papilomavirus.

65 En seres humanos, diferentes tipos de HPV causan distintas enfermedades. Los tipos de HPV 1, 2, 3, 4, 7, 10 y 26-29 producen verrugas benignas en individuos tanto normales como inmunocomprometidos. Los tipos de HPV 5, 8, 9,

ES 2 273 376 T3

12, 14, 15, 17, 19-25, 36 y 46-50 causan lesiones planas en individuos inmunocomprometidos. Los tipos de HPV 6, 11, 34, 39, 41-44 y 51-55 producen condilomas no malignos de la mucosa genital o respiratoria. Los tipos de HPV 16 y 18 producen displasia epitelial de la mucosa genital y están asociados con la mayoría de los carcinomas invasivos e *in situ* del cuello uterino, la vagina, la vulva y el canal anal. HPV6 y HPV11 son los agentes acusantes de más del 90% de todos los condilomas (verrugas genitales) y papilomas laríngeos. El subtipo más abundante del tipo HPV6 es el HPV6a.

Los estudios inmunológicos en animales han mostrado que la producción de anticuerpos neutralizantes frente a los antígenos de papilomavirus previene la infección con los virus homólogos. El desarrollo de vacunas eficaces frente a papilomavirus se ha retrasado por dificultades asociadas con el cultivo de papilomavirus *in vitro*. El desarrollo de una vacuna eficaz frente a HPV se ha retrasado particularmente por la ausencia de un modelo animal adecuado.

La neutralización de papilomavirus por anticuerpos parece ser específica de tipo y depende de los epítomos conformacionales de la superficie del virus.

Los papilomavirus son virus pequeños (50-60 nm), si cubierta, icosaédricos y de ADN, que codifican hasta ocho genes tempranos y dos tardíos. Los marcos de lectura abiertos (ORF) de los genomas de los virus se denominan E1 a E7 y L1 y L2, donde "E" indica temprano y "L" indica tardío. L1 y L2 codifican las proteínas de la cápside de los virus. Los genes tempranos E están asociados con funciones tales como la replicación viral y la transformación celular.

La proteína L1 es la principal proteína de la cápside y posee un peso molecular de 55-60 kDa. La proteína L2 es una proteína minoritaria de la cápside que posee un peso molecular previsto de 55-60 kDa y un peso molecular aparente de 75-100 kDa determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Los datos inmunológicos sugieren que la mayoría, pero no toda la proteína L2, es interna de la proteína L1. Las proteínas L2 están altamente conservadas entre los diferentes papilomavirus, en especial los 10 aminoácidos básicos en el C terminal. El ORF de L1 está altamente conservado entre diferentes papilomavirus.

Los genes L1 y L2 se han usado para generar vacunas para la prevención de infecciones por papilomavirus en animales. Zhou y col. (1991; 1992) clonaron los genes L1 y L2 del HPV tipo 16 en un vector de virus vacunal e infectaron células de mamífero CV-1 con el vector recombinante para producir partículas similares a virus (VLP). Se han generado L1 y L2 de papilomavirus bovino recombinantes derivados de bacterias. Se produjo una reacción cruzada a niveles bajos entre sueros neutralizantes frente a las proteínas bacterianas recombinantes y virus nativos, posiblemente debido a diferencias en las conformaciones de las proteínas nativas y derivadas de bacterias.

Se han usado baculovirus recombinantes que expresan ORF de L1 de HPV6, L1 de HPV11, L1 de HPV 16, L1 de HPV18, L1 de HPV31 o L2 de HPV16 para infectar células SF9 de insecto y producir proteínas L1 y L2. Los análisis de transferencia Western mostraron que las proteínas L1 y L2 derivadas de baculovirus reaccionaron con anticuerpos frente a HPV16. La L1 derivada de baculovirus forma VLP.

Carter y col., (1991) demostraron la producción de proteínas L1 de HPV16 y L2 de HPV16 por cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Carter y col. también demostraron la producción de proteínas L1 y L2 de HPV6b. La proteína L1 de HPV6b no era la proteína L1 de HPV6b de longitud completa. Las proteínas recombinantes se produjeron como productos intracelulares así como secretados. Las proteínas L1 y L2 recombinantes fueron de pesos moleculares similares a las proteínas nativas. Cuando las proteínas se expresaron intracelularmente, se encontró que la mayoría de la proteína era insoluble cuando las células se lisaron en ausencia de reactivos desnaturizantes. Aunque esta insolubilidad puede facilitar la purificación de la proteína, puede dificultar el análisis de los epítomos nativos de la proteína.

El documento EP-A-0659768 (The Austin Research Institute) describe un conjugado entre un antígeno y un polímero de hidratos de carbono, específicamente manano oxidado y MUC1. El conjugado específico indujo una respuesta mediada por célula, pero exhibió poca inmunidad humoral.

Se mostró que las proteínas recombinantes secretadas por levaduras contenían hidratos de carbono derivados de levaduras. La presencia de estos oligosacáridos unidos a N puede enmascarar los epítomos nativos. Además, las proteínas recombinantes secretadas pueden contener otras modificaciones, tales como retención de la secuencia líder secretora.

Sería útil desarrollar procedimientos para producir grandes cantidades de proteínas de papilomavirus de cualquier especie y tipo mediante cultivo de levaduras recombinantes. También sería útil producir grandes cantidades de proteínas de papilomavirus que posean propiedades que confieren inmunidad de las proteínas nativas, tal como la conformación de la proteína nativa.

La presente invención está dirigida a proteínas de papilomavirus recombinantes que poseen las propiedades de conferir inmunidad de las proteínas de papilomavirus nativas así como procedimientos para su producción y uso. La presente invención está dirigida a la producción de una vacuna profiláctica y terapéutica para la infección por papilomavirus. Las proteínas tardías recombinantes de la presente invención son capaces de formar partículas similares a virus. Estas VLP son inmunogénicas e impiden la formación de verrugas en un modelo animal. Además, las proteínas E recombinantes se producen en *E. coli* y estas proteínas se presentan de forma que provocan una respuesta inmunitaria medicada por células. La presente invención usa el papilomavirus de conejo de cola de algodón (CRPV) y el HPV tipo 6 (subtipo 6a) como sistemas modelo.

Sumario de la invención

Se proporcionan formulaciones vacunales que comprenden proteínas recombinantes y tardías (E) ADDUCTED con manano oxidado y proteínas tardías (L) de papilomavirus y manano oxidado así como procedimientos para fabricar y usar las formulaciones.

Breve descripción de las figuras

Las figuras muestran que la infección por CRPV tuvo como resultado el desarrollo de verrugas en todos los puntos de la provocación en animales control. El desarrollo de papilomas se inhibió en > 90% en 3/3 animales del grupo de 4 animales inmunizados con VLP en combinación con proteínas E conjugadas con manano oxidado. Por el contrario, sólo 3/5 animales del grupo 2, inmunizados con mezcla de VLP + proteína E en RIBI y 2/4 animales del grupo 2 inmunizados con mezcla de VLP + oxo-manano-proteína E en RIBI mostraron una inhibición >90% del desarrollo de papilomas. Los resultados sugieren que la inmunización de conejos con un cóctel de proteína E conjugada con manano oxidado en combinación con VLP con L1/L2 causa una inhibición significativa del desarrollo de verrugas de células infectadas por CRPV.

Figura 1. La inmunización de conejos con un cóctel de proteína E en combinación con VLP con L1/L2 inhibe el desarrollo de papilomas inducidos por CRPV.

Figura 2. La comparación de la formulación en CRPV indujo desarrollo de papiloma.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de una mezcla que comprende L1 o L2 de papilomavirus recombinantes o partículas similares a virus de L1 y L2 y proteínas E recombinantes de papilomavirus, donde las proteínas están conjugadas a manano oxidado, en la fabricación de un medicamento capaz de provocar respuestas humorales y mediadas por células frente a antígenos de papilomavirus en un animal y, de este modo, prevenir la infección de dicho animal por papilomavirus.

También se proporciona una composición inmunogénica que comprende L1 o L2 de papilomavirus recombinantes y partículas similares a virus de L1 y L2 y proteínas E recombinantes de papilomavirus donde las proteínas están conjugadas a manano oxidado, en la fabricación de un medicamento capaz de provocar respuestas humorales y mediadas por células frente a antígenos de papilomavirus en un animal.

Además se proporciona una vacuna que comprende L1 o L2 de papilomavirus recombinantes y partículas similares a virus de L1 y L2 y proteínas E recombinantes de papilomavirus donde las proteínas están conjugadas a manano oxidado, en la fabricación de un medicamento capaz de provocar respuestas humorales y mediadas por células frente a antígenos de papilomavirus en un animal.

La presente invención identifica una nueva tecnología que puede ser útil para provocar respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células frente a un antígeno proteico candidato para el desarrollo de vacunas.

El hidróxido de aluminio normalmente provoca potentes respuestas de anticuerpos frente al antígeno candidato y pocas, si algunas, respuestas inmunitarias mediadas por células.

Apostolopoulos y col. demostraron la inducción de fuertes respuestas inmunitarias mediadas por células al antígeno mucina 1 (MUC 1) en ratones cuando los animales fueron inmunizados con el antígeno MUC1 conjugado con manano oxidado (oxo-manano). Sin embargo, la utilidad de oxo-manano como adyuvante o inmunomodulador en el desarrollo de vacunas frente a agentes infecciosos no se ha evaluado.

Es probable que los antígenos conjugados con manano oxidado o reducido provoquen fuertes respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales frente al antígeno candidato. Se ha usado alumbre como adyuvante que provoca buenas respuestas inmunitarias humorales y pocas, si algunas, respuestas inmunitarias mediadas por células.

Una vacuna contra papilomavirus humano que pueda requerir un adyuvante capaz de provocar respuestas tanto humorales como mediadas por células frente a antígenos de papilomavirus. En este informe, los autores describen la utilidad del oxo-manano a la hora de provocar respuestas inmunitarias protectoras frente a agentes infecciosos en un modelo de papilomavirus de conejo de cola de algodón

En este estudio, los autores evaluaron la utilidad del manano oxidado como transportador para el desarrollo de la vacuna e inmunoterapia, los autores han conjugado manano oxidado con antígenos de proteínas tempranas del CRPV (proteínas E) expresados en *E. coli* y evaluaron su eficacia en la contención de la infección preexistente.

Se proporcionan métodos, composiciones y procedimientos para la prevención, caracterización, detección y tratamiento de la infección por papilomavirus (PV). Los procedimientos se basan en la producción de proteínas L1 recombinantes o L2 recombinantes o L1 y L2 recombinantes en levaduras. Las proteínas recombinantes son capaces de simular los epítomos neutralizantes conformaciones de PV nativo. Las proteínas recombinantes L1 o L1 y L2 tam-

5 también pueden ser capaces de formar partículas similares a virus (VLP). Las composiciones de la invención incluyen, entre otras, moléculas de ADN recombinante que codifican las proteínas L1 o L2 o L1 y L2, las proteínas recombinantes bien solas o en combinación con otras proteínas recombinantes, VLP compuestas por al menos una proteína recombinante, fragmentos de las proteínas recombinantes, composiciones farmacéuticas que comprenden la proteínas recombinantes, composiciones vacunales que comprenden las proteínas recombinantes, anticuerpos frente a las proteínas recombinantes o VLP, composiciones inmunogénicas que comprenden al menos una proteína recombinante y kit diagnósticos que comprenden las moléculas de ADN recombinante o las proteínas recombinantes. Los procedimientos de la presente invención incluyen, entre otros, el procedimiento de producir una proteína recombinante que comprende la transformación de una células huésped de levadura adecuada con una molécula de ADN recombinante, cultivando la levadura transformada en condiciones que permitan la expresión del ADN que codifica la proteína recombinante, y purificando la proteína recombinante. Los procedimientos de la presente invención también incluyen la administración de la proteína recombinante, las composiciones de proteínas recombinantes o VLP a un animal, incluidos, entre otros, los seres humanos. Las células huésped adecuadas se incluyen, entre otras, cepas de levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyvermyces*, *Schizosaccharomyces* y *Hansenula*.

15 Los estudios inmunológicos en animales han mostrado que la producción de anticuerpos neutralizantes frente a proteínas de la cápside de papilomavirus previene la infección con los virus homólogos. El desarrollo de vacunas eficaces frente a papilomavirus se ha retrasado por dificultades asociadas con el cultivo de papilomavirus *in vitro*. El desarrollo de una vacuna eficaz frente a HPV se ha retrasado particularmente por la ausencia de un modelo animal adecuado.

20 La neutralización de papilomavirus por anticuerpos parece ser específica de tipo y depende de los epítomos conformacionales de la superficie del virus.

25 Se pueden formular composiciones farmacéuticamente útiles que comprenden las proteínas o VLP de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la mezcla de un transportador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tales transportadores y procedimientos de formulación se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences. Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz de la proteína o VLP. Tales composiciones pueden contener proteínas o VLP derivadas de más de un tipo de HPV.

30 Composiciones terapéuticas o diagnósticas de la invención se administran a un individuo en cantidades suficientes para tratar o diagnosticar infecciones de PV. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con una variedad de factores tales como el estado del individuo, el peso, el sexo y la edad. Entre otros factores se incluyen el modo de administración. En general, las composiciones se administrarán en dosis que varían de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 250 μg .

35 Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar al individuo mediante una variedad de vías tales como subcutánea, tópica, oral, mucosa e intramuscular.

40 Las vacunas de la invención comprenden proteínas recombinantes o VLP que contienen los determinantes antigénicos necesarios para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes en el huésped. Tales vacunas también son lo bastante seguras como para administrarse sin peligro de infección clínica; no producen efectos secundarios; se pueden administrar por una vía eficaz; son estables; y son compatibles con los transportadores de la vacuna.

45 Las vacunas pueden administrarse por una variedad de vías, tales como oralmente, parenteralmente, subcutáneamente, mucosalmente o intramuscularmente. La dosis administrada puede variar con el estado, el sexo, el peso y la edad del individuo; la vía de administración y el tipo PV de la vacuna. La vacuna puede usarse en formas de dosificación tales como cápsulas, suspensiones, elixires o soluciones líquidas. La vacuna se puede formular con un transportador inmunológicamente aceptable.

50 Las vacunas se administran en cantidades terapéuticamente eficaces, es decir, en cantidades suficientes como para generar una respuesta inmunológicamente protectora. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con el tipo de PV. La vacuna se puede administrar en dosis únicas o múltiples.

55 El uso de la presente invención hace posible la formulación de vacunas subvirales para prevenir la infección por PV. Usando los procedimientos, se pueden fabricar vacunas de PV monovalentes o multivalentes. Por ejemplo, una vacuna monovalente frente al HPV de tipo 16 se puede fabricar mediante la formulación de la proteína recombinante L1 del HPV 16 y la proteína L2 o las proteínas L1 y L2. Como alternativa, se puede formular una vacuna multivalente frente a HPV mezclando las proteínas L1 o L2 o L1 y L2 o VLP de diferentes tipos de HPV.

60 Las proteínas recombinantes y VLP de la presente invención se pueden usar en la formulación de composiciones inmunogénicas. Tales composiciones, cuando se introducen en un huésped adecuado, son capaces de inducir una respuesta inmunológica en el huésped.

65 Las proteínas recombinantes y VLP pueden usarse para generar anticuerpos. El término "anticuerpo" Como se usa en la presente memoria descriptiva incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)2 que son capaces de unirse al antígeno o hapteno.

ES 2 273 376 T3

Las proteínas recombinantes, VLP y anticuerpos de la presente invención se pueden usar para determinar el serotipo de la infección por HPV y la selección de HPV. Las proteínas recombinantes, VLP y anticuerpos se prestan a la formulación de kit adecuados para la detección y serotipaje de HPV. Tal kit comprendería un transportador adecuado para mantener en estrecho aislamiento al menos un envase. El transportador además comprendería reactivos tales como proteína de HPV recombinante o VLP o anticuerpos anti-HPV adecuados para detectar una variedad de tipos de HPV. El transportador también puede contener medios para la detección tales como antígeno marcado o sustratos enzimáticos o similares.

Las proteínas recombinantes y VLP de la presente invención también son útiles como marcadores de peso molecular y de tamaño molecular.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para definir más la invención sin, no obstante, limitar la invención a los casos concretos de estos ejemplos.

15 Ejemplo 1

Expresión de los genes de CRPV E1, E2, E4, E5, E6 y E7 en E. coli

Para amplificar los genes de longitud completa de CRPV E1, E2, E4, E5, E6 y E7 se usaron cebadores de PCR basados en la secuencia publicada del CRPV (Yaniv, M. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1580-1584, 1985). Para aumentar la expresión de la proteína E4 de CRPV, los primeros 4 codines de aminoácidos de la proteína E1 del CRPV se fusionaron con la porción amino terminal de E4 usando PCR (E1⁴). Los marcos de lectura abiertos de los genes E6 y E7 se fusionaron en el extremo carboxi de E6 con el amino terminal de E7 usando PCR. Todos los productos amplificados por PCR se subclonaron en el vector pQE30 (Quiagen, Inc., San Diego, CA) y se secuenciaron. La expresión de la proteína deseada se llevó a cabo mediante crecimiento en cultivos de 1 litro de *E. coli* SG-1300 expresando las proteínas E deseadas durante ocho horas a 37°C en medio LB y después se indujo durante la noche a 30°C usando IPTG 1 mM. A continuación, las células se recogieron mediante centrifugación durante 15 minutos a 5000 rpm, se lavaron con 500 ml de PBS y las proteínas E se purificaron usando las instrucciones del fabricante (Quiagen, Inc.).

30 Ejemplo 2

Purificación de las proteínas E de CRPV

La pasta de cultivo de *E. coli* (de 1 litro de medio) se solubilizó en 100 ml de tampón de extracción (Clorhidrato de guanidina 6,0, imidazol 2 mM y 2 β -mercaptoetanol 0,35 mM, fosfato sódico 0,1M a pH 7,4) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La fracción soluble se aisló mediante centrifugación a 18000 x g durante 30 minutos u se mezcló con 8,0 ml de resina de Ni concentrada equilibrada con el tampón de extracción. La pasta de resina se rotó durante 2 horas a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante centrifugación a 200 x g. La resina se lavó con volúmenes de 4,0 del tampón de extracción y del tampón A (urea 8,0M, fosfato sódico 0,1M pH 7,4). A temperatura ambiente. LA resina se resuspendió en tampón A a pH 6,3 y se transfirió a una columna y se lavó secuencialmente con 4 volúmenes de tampón B (urea 8,0M, imidazol 10 mM, fosfato sódico 0,1M, pH 6,3), tampón C (urea 8,0 M, imidazol 200 mM, fosfato sódico 0,1 M, pH 6,3), tampón D (urea 8,0 M, imidazol 500 mM, fosfato sódico, pH 5,7) y, por último, con tampón E (urea 8,0 M, imidazol 1,0 mM, fosfato sódico 0,1 M, pH 5,7). La proteína purificada eluyeron en tampón C, D y F. La proteína se cuantificó con ensayos proteicos de Bradford o BCA y se analizó mediante SDS-PAGE y transferencia Western. Las proteínas purificadas se dializaron extensamente con agua desionizada para eliminar la urea antes de la conjugación u otras formulaciones (Quiagen Inc. Manual).

50 Ejemplo 3

Expresión de los genes de L1 y L2 de CRPV como partículas similares a virus (VLP)

Para amplificar el gen de longitud completa de CRPV L1 y el gen de CRPV L2 que tenían los 37 primeros codones (111 pb) delecionados se usaron cebadores de PCR basados en la secuencia publicada del CRPV (Yaniv, M. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1580-1584, 1985). Estos genes se subclonaron en el vector de 2 casetes pAcUW51 (PharMingen Inc., San Diego, CA) para la coexpresión en el sistema de expresión de baculovirus o en un vector de 2 casetes pLS110 (Hofman, K, J y col. J. Virol 209: 506-518, 1995) para expresión en levaduras. El vector pAcUW51 que contiene los genes que codifican las proteínas L1 y L2 de CRPV1 se transfeccionó en las células SF9 usando el kit de expresión de PharMingen Baculogold. Los sobrenadantes de esta transfección se usaron para infectar grandes cultivos (1 litro) de células SF9 que se cultivaron durante 5 días, las células se recogieron y las VLP con L1/L2 se purificaron.

El vector Pls110 que contiene los genes que codifican las proteínas L1 y L2 de CRPV se transformó en levaduras usando el protocolo de transformación con esferoplastos estándar. Se identificaron los clones positivos y se cultivaron cultivos a gran escala. Se cultivaron cultivos de 200 ml de levaduras que expresan VLP con L1/L2 durante 2 días a 30°C. A continuación, este cultivo de 200 ml se usó para inocular 1 litro de medio de inducción (2% de extracto de levadura, 1% de peptona de soja, 1,6% de glucosa, 4% de galactosa) que se cultivó a 30°C durante 5 días. Las células se recolectaron mediante centrifugación y las VLP con L1/L2 se purificaron.

ES 2 273 376 T3

Ejemplo 4

Conjugación de manano con proteínas E

5 Las proteínas E de CRPV de *E. coli* se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni y se sometieron a diálisis extensa contra agua desionizada. Las proteínas E de CRPV se mezclaron (E1, E2, E6⁷ 150 µg de cada uno; 100 µg de E1⁴ y 50 µg de E5 por dosis) y se liofilizaron. Se disolvieron 14 mg de manano (purificado de *Saccharomyces SIGMA Chemical Co.*) en 1,0 ml de tampón fosfato 0,1M a pH 6,0, se mezclaron con 20 µl de peryodato de sodio 0,1M y se incubaron durante 1h a 4°C. Se añadió etanodiol (20 µl) y se incubó durante otros
10 30 minutos a 4°C y la mezcla se pasó a través de una columna PD-10 equilibrada en tampón bicarbonato a pH 8,0 (Apostolopoulos. V. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 10128-10132, 1995). El manano oxidado que eluyó en volumen de vacío se mezcló con mezcla de proteínas E liofilizadas y se incubó a temperatura ambiente durante la noche y se usó.

15 Ejemplo 5

Conjugación de manano con proteínas E

20 Las proteínas E de CRPV de *E. coli* se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni y se sometieron a diálisis extensa contra agua desionizada. Las proteínas E de CRPV se mezclaron (E1, E2, E6⁷ 150 µg de cada uno; 100 µg de E1⁴ y 50 µg de E5 por dosis) y se liofilizaron. Se disolvieron 14 mg de manano (purificado de *Saccharomyces SIGMA Chemical Co.*) en 1,0 ml de tampón fosfato 0,1M a pH 6,0, se mezclaron con 20 µl de peryodato de sodio 0,1M y se incubaron durante 1h a 4°C. Se añadió etanodiol (20 µl) y se incubó durante otros 30 minutos a 4°C y la mezcla se pasó a través de una columna PD-10 equilibrada en tampón bicarbonato (0,02M, a pH
25 8,0). El manano oxidado que eluyó en volumen de vacío se mezcló con mezcla de proteínas E liofilizadas y se incubó a temperatura ambiente durante la noche.

Ejemplo 6

Evaluación de la vacuna de oxo-manano-proteína E en el modelo de CRPV

Cinco ratones fueron inmunizados con 25 µg de VLP con L1/L2 derivados de levaduras con 150 µg de cada uno de E1, E2, E1⁴, E6⁷ y 50 µg de E5, proteínas E de CRPV en RIBI (grupo 1). Cuatro conejos fueron inmunizados con la misma mezcla en RIBI, con la excepción de que las proteínas E se conjugaron con el polisacárido oxidado manano (oxo-manano-proteína E, grupo 2). Cada uno de tres conejos recibió RIBI únicamente (grupo 3) o VLP con L1/L2 +
35 oxo-manano-proteína E sin RIBI (grupo 4). Cada conejo recibió 0,3 ml cada uno por vía intramuscular en sus patas traseras, 0,5 ml cada por vía intradérmica en 6 puntos y 0,1 ml por vía subcutánea en el cuello, de la formulación deseada. Los conejos e infectaron con el papilomavirus 4 de conejo de cola de algodón (CRPV) después de la primera inmunización y se inyectó refuerzo con la misma cantidad de antígeno en la misma formulación el día 21 y el día 42.
40 El tamaño de los papilomas se determinó el día 35 y el día 47 después de la infección.

Ejemplo 7

Resultados

45 LA infección con CRPV tuvo como resultado el desarrollo de verrugas en todos los sitios expuestos en los animales control. El desarrollo de papilomas se inhibió en > 90% en 3/3 animales del grupo 4 inmunizados con la mezcla proteica de VLP+oxo-manano-proteína E sin RIBI. Por el contrario, sólo 3/5 animales del grupo 1, inmunizados con mezcla de VLP + proteína E en RIBI y 2/4 animales del grupo 2 inmunizados con mezcla de VLP + oxo-manano-
50 proteína E en RIBI mostraron una inhibición >90% del desarrollo de papilomas. La inhibición del desarrollo de papilomas en los 2 animales restantes del grupo 1 fue del 80% y en el grupo 2 varió de 10-50%. Los resultados sugieren que la inmunización de conejos con un cóctel de proteína E conjugada en combinación con VLP con L1/L2 en RIBI causa una inhibición significativa (80-90%) del desarrollo de verrugas. Es interesante el hecho de que también se observó una inhibición similar del desarrollo de verrugas en animales inmunizados con la formulación que sólo
55 contenía el cóctel de VLP y proteína E conjugada con manano oxidado (Figura 1).

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una mezcla que comprende partículas similares a virus con L1 o L2 o L1 y L2 de papilomavirus recombinantes y proteínas E recombinantes de papilomavirus, donde las proteínas están conjugadas con manano oxidado, en la fabricación de un medicamento capaz de provocar respuestas tanto humorales como mediadas por células frente a los antígenos de papilomavirus en un animal y, de este modo, prevenir la infección de dicho animal por papilomavirus.

10 2. Una composición inmunogénica que comprende partículas similares a virus con L1 o L2 o L1 y L2 de papilomavirus recombinantes y proteínas E recombinantes de papilomavirus, donde las proteínas están conjugadas con manano oxidado, capaz de provocar respuestas tanto humorales como mediadas por células frente a los antígenos de papilomavirus en un animal.

15 3. Una vacuna que comprende partículas similares a virus con L1 o L2 o L1 y L2 de papilomavirus recombinantes y proteínas E recombinantes de papilomavirus, donde las proteínas están conjugadas con manano oxidado, capaz de provocar respuestas tanto humorales como mediadas por células frente a los antígenos de papilomavirus en un animal.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

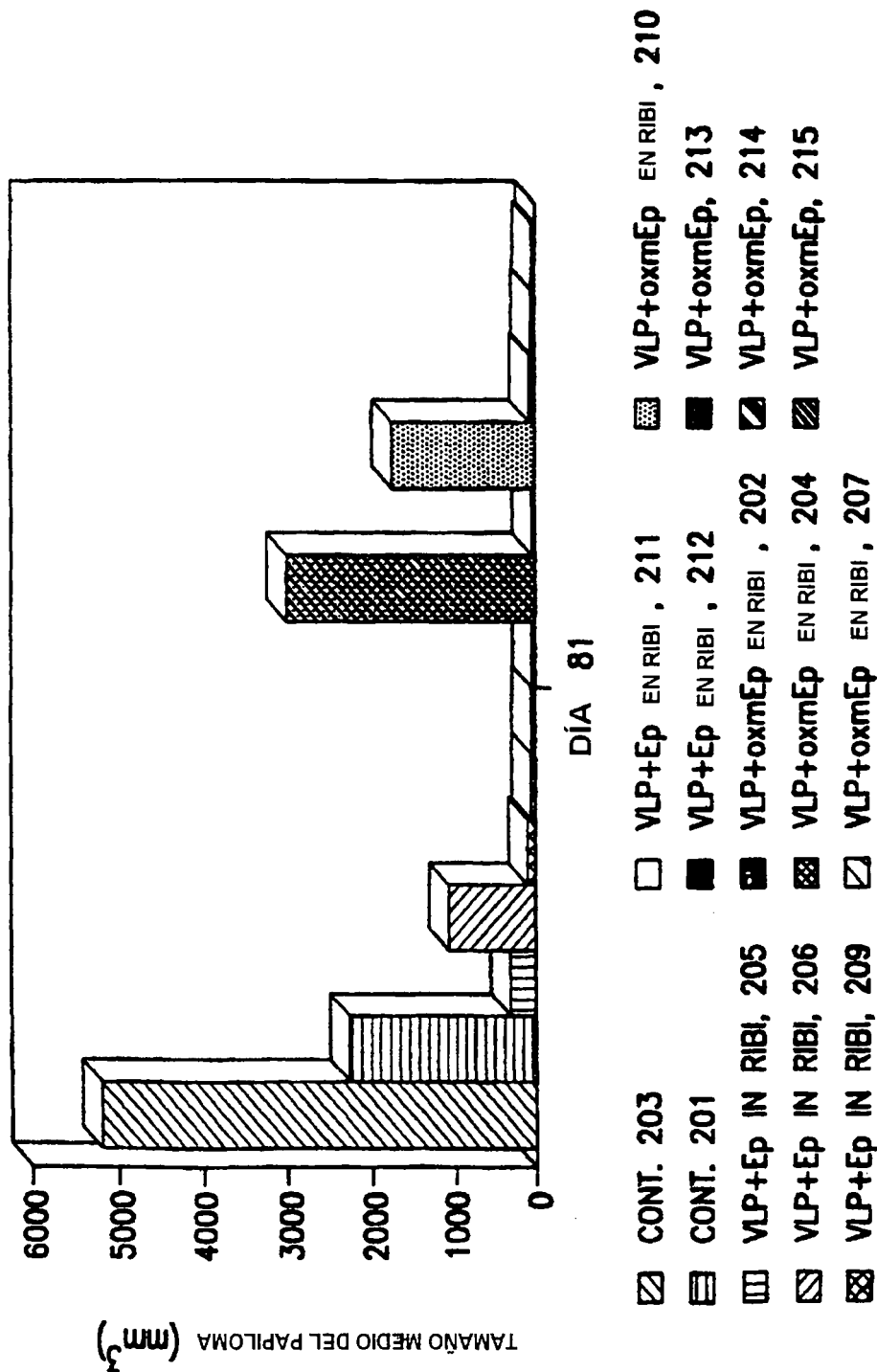


FIG.1

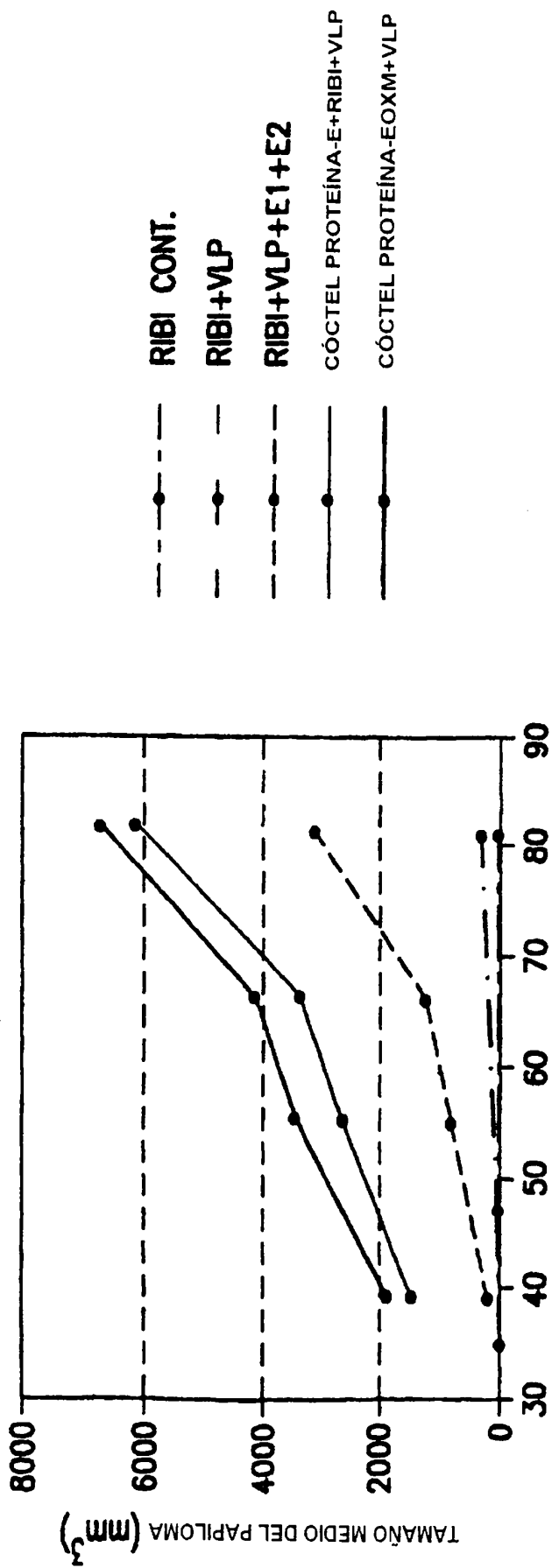


FIG.2