



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 910**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01942147 .8**
96 Fecha de presentación : **11.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1305039**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54 Título: **Formas (fijas) estables de proteínas de cápside L1 virales, proteínas de fusión y sus utilizaciones.**

30 Prioridad: **06.07.2000 US 216526 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **Georgetown University**
3900 Reservoir Road, N.W.
Washington, District of Columbia 20007, US

72 Inventor/es: **Schlegel, C., Richard y**
Garcea, Robert

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 317 910 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

Formas (fijas) estables de proteínas de cápside L1 virales, proteínas de fusión y sus utilizaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona unos medios eficientes para producir vacunas que contienen proteínas estables de cápsides virales. Más específicamente, la presente invención produce nuevas vacunas y agentes diagnósticos para la prevención, tratamiento y/o diagnóstico de la infección viral, especialmente, de la infección por el virus del papiloma y los cánceres cervicales asociados con ellos.

Antecedentes de la invención

Los papilomavirus infectan una amplia variedad de distintas especies de animales, incluyendo al hombre. La infección se caracteriza típicamente por la inducción de tumores fibro-epiteliales y epiteliales benignos, o verrugas en el lugar de la infección. Cada especie de vertebrado se infecta por un conjunto especie-específico de papilomavirus, comprendiendo él mismo distintos tipos de papilomavirus. Por ejemplo, se han aislado más de 60 genotipos distintos de papilomavirus humanos (HPV). Los papilomavirus son agentes infecciosos altamente especie-específicos. Por ejemplo, los papilomavirus caninos y de conejo no pueden inducir papilomas en especies heterólogas tales como el hombre. La inmunidad neutralizante para la infección contra un tipo de papilomavirus no confiere inmunidad generalmente contra otro tipo, incluso cuando los tipos infectan a una especie homóloga.

En el hombre, los papilomavirus provocan verrugas genitales, una enfermedad predominante transmitida sexualmente, estando los tipos 6 y 11 del HPV asociados más habitualmente con las verrugas genitales benignas (denominadas) condilomas acuminados. Las verrugas genitales son muy habituales, y la infección subclínica o inaparente de HPV es incluso más habitual que la infección clínica. Mientras que la mayoría de las lesiones inducidas por el HPV son benignas, las lesiones que proceden de ciertos tipos de papilomavirus, por ejemplo, HPV-16 y HPV-18, pueden experimentar una transformación maligna. Además, la infección por uno de los tipos de papilomavirus asociados con la transformación maligna, se considera un factor significativo de riesgo en el desarrollo del cáncer cervical, el segundo cáncer más habitual de las mujeres en el mundo. De los genotipos del HPV que están implicados en el cáncer cervical, el HPV-16 es el más habitual, encontrándose en aproximadamente 50% de los cánceres cervicales. El predominio del HPV-18 es del orden de aproximadamente 8-31%, dependiendo de la localización geográfica, y en la mayoría de las áreas del mundo, el HPV-45 es el tercer tipo oncogénico HPV más frecuente (Bosch, F.X., *et al* (1995, J.Natl.Cancer Inst. 87:796-802).

En vista, generalmente, de los riesgos significativos para la salud que implica la infección humana por los papilomavirus, y en particular, por los papilomavirus humanos, varios grupos han informado del desarrollo de antígenos de papilomavirus recombinantes y de su utilización como agentes de diagnóstico y como vacunas profilácticas. En general, dicha investigación se ha centrado en la producción de vacunas profilácticas que contengan la proteína más importante de la cápside (L1), sola o en combinación con la proteína menos importante de la cápside (L2). Por ejemplo, Ghim *et al*, *Virology*, 190:548-552 (1992), informó de la expresión de la proteína HPV-1 L1, utilizando la expresión de la vacuna en las células Cos, que mostraron epítomos conformacionales y su utilización como vacuna o para la detección o la tipificación serológica. Este trabajo constituye también la base de una solicitud de patente, solicitud nº 20020068326 de patente US (nº de serie 08/216.506) archivada el 22 de mayo de 1994, que ha sido autorizada por el cesionario de esta solicitud. También, Suzich *et al.*, *Proc. Natl.Acad. Sci, USA*, 92:11553-11557 (1995), informan de que la inmunización de los perros con un papilomavirus recombinante canino oral (COPV), que se expresa en un sistema celular baculovirus/insecto, previno completamente el desarrollo de papilomas virales mucosos. Estos resultados son importantes, dadas las similitudes significativas entre muchos HPVs y COPV. Por ejemplo, COPV, similar a los HPVs asociados con el cáncer anogenital y genital, infecta e induce lesiones en un lugar de la mucosa. Asimismo, las secuencias L1 de COPV comparten similitudes estructurales con las secuencias HPV L1. Dadas estas similitudes, el modelo COPV/sabueso es útil para la investigación de las vacunas que contienen la proteína L1, por ejemplo, la investigación de la respuesta inmune protectora, la protección de la infección natural y la optimización de los protocolos de vacunación (*Id*).

También, un grupo de investigación de la University of Rochester informó de la producción de la proteína mayor de la cápside viral del papiloma humano (L1) y de las partículas de tipo viral, utilizando un sistema de expresión celular baculovirus/insecto (Rose *et al.*, Universidad de Rochester, WO 94/20137, publicado el 15 de septiembre de 1994). En particular, informaron de que la expresión de la proteína L1 mayor de la cápside de HPV-6 y de HPV-11 y la producción de las partículas tipo-virus HPV-6, HPV-11, HPV-16 y HPV-18.

Además, un grupo de investigación de la University of Queensland dio a conocer supuestamente la producción recombinante de las proteínas L1 y/o L2 del papilomavirus y las partículas tipo virus, así como su utilización potencial como vacunas (Frazer *et al.*, WO 93/02189, publicado el 4 de febrero de 1993).

Además todavía, un grupo de investigación del Gobierno de los Estados Unidos informó de proteínas recombinantes de la cápside del papilomavirus capaces supuestamente de autoensamblarse en estructuras capsoméricas y cápsides virales que comprenden epítomos antigénicos conformacionales (patente US nº 5.437.951, Lowy *et al*, publicado el 1 de agosto de 1995). Las reivindicaciones de esta patente se dirigen a una secuencia específica de ADN HPV-16

ES 2 317 910 T3

que codifica una proteína L1 capaz de autoensamblarse y utilizarse para expresar cápsides del HPV-16 recombinante conteniendo dicha proteína HPV-16L1.

5 Con respecto a las vacunas que contienen la proteína de la cápside del HPV, se acepta hoy ampliamente por los expertos en la materia, que un prerrequisito necesario de una vacuna eficaz que se basa en la proteína mayor HPV L1 de la cápside, es que la proteína L1 presente epítomos conformacionales que se expresan mediante las proteínas originales mayores de la cápside del papilomavirus humano (véase, por ejemplo, Hines *et al.*, *Gynecologic Oncology*, 53: 13-20 (1944); Suzich *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 92: 11553-11557 (1995)).

10 En la literatura se ha informado de las proteínas recombinantes HPV L1, tanto particuladas como no particuladas, que presentan epítomos HPV L1 conformacionales originales. Se sabe que L1 es estable en varias conformaciones oligoméricas, por ejemplo, (i) capsómeros que comprenden pentámeros de la proteína L y (ii) cápsidas que están constituidas por 72 capsómeros en una estructura icosaédrica T=7. También, es sabido que la proteína L1, cuando se expresa en las células eucarióticas por sí misma, o en combinación con L2, es capaz de autoensamblarse eficientemente en estructuras de tipo cápside, a las que se hace referencia como partículas de tipo vírico (VLP).

15 Se ha informado de que las VLP son morfológica y antigénicamente similares a viriones auténticos. Asimismo, se ha informado de que la inmunización con VLP da lugar a la producción de anticuerpos neutralizantes de virus. Por ejemplo, los resultados con diversos papilomavirus animales (papilomavirus orales caninos y papilomavirus-4 bovinos) han sugerido que la inmunización con VLP da lugar a la protección contra la subsiguiente infección con papilomavirus. En consecuencia, las VLP compuestas de proteínas HPV L1 se han propuesto como vacunas para prevenir enfermedades asociadas con las infecciones de papilomavirus humano.

20 Específicamente, se ha informado de que la proteína L1 puede ensamblarse en el interior de VLP cuando se expresa utilizando baculovirus recombinantes y vectores víricos vacunales, y en la levadura recombinante (Hagensee *et al.*, *J. Virol.*, 68:4503-4505 (1994); Hofmann *et al.*, *Virology*, 209:506-518 (1995); Kimbauer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:12180-12184 (1992); Kimbauer *et al.*, *J. Virol.*, 67:6929-6936 (1993); Rose *et al.*, *J. Virol.*, 67:1936-1944 (1993); Sasagawa *et al.*, *Virology*, 206:126-135 (1995); Suzich *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11533-11557 (1995). Volpers *et al.*, *Virology*, 200:504-512 (1994); Zhou *et al.*, *J. Virol.*, 68:619-625 (1994).

30 La mayoría de las preparaciones previas de L1 recombinante aisladas a partir de las células eucarióticas han dado lugar a una población variable de VLPS de aproximadamente 55 nm de diámetro, que en apariencia son similares a los viriones intactos. Sin embargo, el ensamblaje de las VLP es algo sensible al tipo celular. Por ejemplo, la L1 que se expresa en *Escherichia coli*, lo hace ampliamente en forma de capsómeros o más pequeña, con pocas cápsides o sin cápsides aparentes, bien en la célula o después de la purificación (Rose *et al.*, *J. Virol.*, 67:1936-1944 (1993); Li *et al.*, *J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)). Resultados similares se observan cuando la proteína VP1 del poliovirus se expresa en *E. coli* (Salunke *et al.*, *Biophys. J.*, 56:887-90 (1989)).

40 Aunque las células eucarióticas se han dedicado a la producción de proteínas de la cápside de los papilomavirus y de las de otros virus, a causa de su conocida capacidad para expresar estas proteínas y las VLP de forma que presenten epítomos neutralizantes conformacionales apropiados, han existido algunos informes de la utilización de bacterias para la expresión de las proteínas de la cápside del papilomavirus, tanto en forma fusionada como no fusionada, así como para la producción de los capsómeros.

45 Por ejemplo, en PCT/US98/13799, titulada "Homogeneous Human Papillomavirus Capsomere Containing Compositions, Methods for Manufacture, and Use Thereof as Diagnostic, Prophylactic or Therapeutic Agents", se dio a conocer que los capsómeros expresados en *E. coli* pudieron generar antiseros neutralizantes en conejos, que previnieron la infección de papilomavirus en un ensayo modelo de cultivo tisular. Estos capsómeros se expresaron como proteínas de no-fusión. Por tanto, las proteínas L1 que se expresaron, no incluían ninguna secuencia PV no codificante.

50 Asimismo, Li *et al.*, *J. Virol.*, 71:2987 (1997) informaron de la expresión de una proteína HPV 11L1 completa de no fusión, en *E. coli*, que presentaba epítomos conformacionales. Sin embargo, los niveles de expresión fueron relativamente bajos, y el procedimiento de purificación necesario para aislar el producto de expresión fue muy laborioso.

55 Además, Lin *et al.*, *Virology*, 187:612-619 (1992), informó de la expresión de proteínas de fusión CRPV trpE-L1 en *E. coli* y de la utilización del producto de expresión resultante para inducir antiseros en conejos. La proteína de fusión se expresó en formas corporales insolubles y refráctiles, y las fracciones insolubles que contenían las proteínas de fusión trpE se caracterizaron mediante SDS-PAGE, utilizándose la proteína en bruto de fusión resultante para inmunizar conejos conjuntamente con un adyuvante inmune (emulsión MPL y TDM y CWS) (Ribi Immunochemical Research Inc, (adyuvante)). Sin embargo, dicho extracto proteico impuro sería inapropiado para el uso como vacuna, a causa de la potencial contaminación endotoxínica. Además, Lin *et al.*, en *J. Virol.*, 67(7):4154-4162 (1993) informaron de la expresión de la proteína CRPV L1 en *E. coli* como una proteína TrpE de fusión. Informaron de la identificación de epítomos neutralizantes y dieron a conocer posteriormente que una vacuna exitosa contra los papilomavirus debe basarse en la inmunización con la L1 original y completa, y que péptidos más pequeños conteniendo epítomos lineales completos, no son factibles.

65 Además todavía, Zhang *et al.*, *Virology*, 243:4236-431 (1996) informaron de la expresión de proteínas HPV 16 L1 en *E. coli*, en la que la secuencia de L1 se fusionó en su final amino a una secuencia líder de 24 aminoácidos,

pe1B, y el extremo carboxilo a seis residuos de histidina (marcación His). Sin embargo, desafortunadamente, la proteína bacteriana L1 que se expresó fue en forma de agregados insolubles (cuerpos de inclusión) que se expresaron con un rendimiento de más del 10% de las proteínas celulares totales. Las proteínas insolubles, cuando se aislaron con 8M urea y se purificaron mediante separación cromatográfica, y después de la remoción de la urea, se reunieron espontáneamente u se ensamblaron, *in vitro*, en agregados polimórficos que incluían estructuras parecidas a cápsides originales vacías, así como cápsidas incompletamente formadas. Las VLP correctamente plegadas se purificaron mediante sedimentación de gradiente en sacarosa, y fueron reconocidas mediante un anticuerpo monoclonal conformacional específico del tipo HPV16, en un ELISA. Sin embargo, el procedimiento de purificación fue muy laborioso, lo que no es ventajoso en el contexto de la preparación de la vacuna, en la que son necesarios altos rendimientos proteicos con costes razonables.

Objetivos de la invención

Un objetivo de la invención consiste en resolver los problemas de la técnica anterior.

Más específicamente, un objetivo de la invención consiste en proporcionar unos medios mejorados para la producción de proteínas recombinantes de cápsides virales, lo cual es sencillo, y produce proteínas de la cápside viral apropiadas para su utilización como vacunas y como (agentes) terapéuticos y diagnósticos. Este procedimiento es apropiado para las proteínas de la cápside de virus tanto con envuelta como sin ella, pero resulta especialmente preferido para proteínas de cápsides virales sin envuelta.

Más específicamente, incluso, un objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento mejorado para la producción de proteínas recombinantes de la cápside del papilomavirus, es decir, proteínas L1, lo cual es sencillo, proporciona un alto rendimiento proteico, y que da lugar a composiciones proteicas de la cápside del papilomavirus que son apropiadas para su utilización como vacunas, agentes terapéuticos y diagnósticos.

Un objetivo específico de la invención consiste en proporcionar proteínas de la cápside del papilomavirus (PV), es decir, proteínas L1, o sus fragmentos, fusionados en sus extremos carboxilo o amino a la proteína glutatión-S-transferasa (GST).

Otro objetivo específico de la invención consiste en expresar una proteína PS de la cápside o un fragmento suyo fusionada a la proteína glutatión-S-transferasa (GST), y purificar la fusión cápside-GST resultante mediante cromatografía de afinidad (cromatografía glutatión sepharosa).

Un objetivo más específico de la invención consiste en expresar una proteína PVL1 como una proteína de fusión GST y purificar la fusión resultante PV L1-GST mediante cromatografía glutatión sepharosa).

Otro objetivo específico de la invención consiste en proporcionar preparaciones de proteínas estables de cápsides virales que presenten epítomos conformacionales de las proteínas originales, preferentemente neutralizantes, que son producidos mediante precipitación acetónica o alcohólica (es decir, metanol, butanol), seguido por secado para producir un polvo estable.

Otro objetivo específico de la invención consiste en producir bacterias intactas -fijadas en acetona o alcohol- que expresan proteínas de la cápside viral que son apropiadas para utilizarlas como agentes diagnósticos, terapéuticos o profilácticos, por ejemplo, vacunas veterinarias.

Un objetivo más específico de la presente invención consiste en producir bacterias intactas -fijadas en acetona o alcohol- que expresan proteínas PV de la cápside, de forma fusionada o no, para utilizar como agentes diagnósticos, terapéuticos o profilácticos.

Otro objetivo específico de la invención consiste en proporcionar un nuevo procedimiento para administrar vacunas proteicas de cápsides virales, especialmente de vacunas basadas en proteínas de cápsides sin envuelta, produciendo dichas proteínas de la cápside o las bacterias que expresan dichas proteínas de la cápside en forma de un polvo fijado en acetona o alcohol que se administra "soplando" el polvo a través de la piel, o mediante otras vías de administración del aerosol (por ejemplo, intranasal).

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar composiciones proteicas de cápsides virales de almacenamiento estable, especialmente proteínas de cápsides de papilomavirus, en forma fusionada o no, que comprenden polvos acetónicos o alcohólicos (de etanol o metanol).

Todavía otro objetivo de la invención consiste en proporcionar bacterias intactas fijadas en acetona que expresen proteínas de cápsides virales, especialmente proteínas PV de cápsides, que son apropiadas para utilizarlas como agentes diagnósticos, terapéuticos y profilácticos.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar kits de diagnóstico para la detección de anticuerpos virales, que comprenden bacterias fijadas en acetona o alcohol o polvos de acetona o alcohol que contienen proteínas de cápsides virales, por ejemplo, proteínas PV de las cápsides, que conservan la apropiada (original) conformación proteica de la cápside.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un constructo de ADN utilizado para expresar una proteína de fusión GST-COPVL1 en *E.coli*.

5 La Figura 2 contiene resultados de un ELISA, que muestran que tanto GST-L1 como la proteína L1 purificada (no-fusión) reaccionan con un anticuerpo para un epítipo lineal (no conformacional). Puede apreciarse que las proteínas L1 que se expresan bacteriamente muestran epítipos no conformacionales que no se encuentran en el virus intacto completo.

10 La Figura 3 contiene resultados de otro ELISA que muestra que la proteína de fusión GST-L1 y las proteínas L1 que se expresan en las bacterias, muestran también epítipos conformacionales que se basan en su reactividad específica con anticuerpos anti-COPV conformacional-dependientes.

15 La Figura 4 contiene resultados de la cromatografía SDS-PAGE gel. Los resultados indican que las proteínas GST-L1 y L1 que se expresan bacteriamente son equitativamente homogéneas (encontradas predominantemente en una banda única sobre SDS-gel), con sólo una ligera contaminación observable en la banda de la proteína GST-L1.

20 La Figura 5 contiene resultados de un estudio en perros (sabuesos) que indicó que la administración de la proteína GST-L1 a bajas dosis (1 µg) dio lugar a una protección completa después del estímulo.

Las Figuras 6A y 6B contienen resultados de ensayos ELISA que indican que las proteínas de fusión GST-L1 que contienen polvos de acetona reaccionan con anticuerpos monoclonales conformacionales PV de forma muy similar a las proteínas de fusión GST-L1 no fijadas en acetona.

25 Descripción detallada de la invención

Para facilitar un entendimiento de la invención, se proporcionan las definiciones siguientes. Además, todos los términos técnicos presentan sus definiciones habituales, reconocidas en la técnica.

30 *Proteína de la cápside*: la proteína estructural de un virus, por ejemplo, con envuelta o sin envuelta, que constituye la estructura de la cápside. Generalmente, existen varias proteínas de la cápside que se describen a menudo indicando si son constituyentes predominantes (las mayores) o no predominantes (las menores) de la estructura de la cápside.

35 *Proteína grande de la cápside o proteína L1*: La proteína estructural del papilomavirus (PV) que constituye la porción mayor de la estructura de la cápside del PV. Se ha informado de la aplicación de esta proteína en la preparación de las vacunas HPV y como agente diagnóstico.

40 *Partículas de tipo viral o VLP*: Estructuras de tipo cápside que se producen después de la expresión y ensamblaje de una secuencia L1 ADN del papilomavirus, sola o combinada con una secuencia L2 ADN. Las VLP son morfológica y antigénicamente similares a viriones auténticos. Las VLP pueden producirse *in vivo*, en células huésped apropiadas, por ejemplo, células huéspedes de insectos y de mamíferos, o pueden formarse espontáneamente después de la purificación de las proteínas recombinantes L1. Además, pueden producirse utilizando fragmentos L1 o las formas mutadas de estos, por ejemplo, proteínas L1 que se han modificado por la adición, sustitución o delección de uno o más aminoácidos. Los mutantes L1 que pertenecen al alcance de la presente invención, son aquéllos que después de la expresión presentan, por lo menos, un epítipo PV original conformacional. Por ejemplo, incluye proteínas L1 que se truncaron en el último residuo conservado de glutamina en el extremo carboxilo. La escisión en dicho residuo de glutamina eliminará, como promedio, de 30 a 40 residuos aminoácidos de la proteína L1. Pueden determinarse mutantes o fragmentos apropiados basándose en la reactividad de dichas proteínas L1 con antisuero neutralizante o su capacidad para producir un antisuero neutralizante.

50 *Proteína L1 correctamente plegada*: La proteína L1, sus fragmentos, o su forma mutada (monomérica, en forma de pequeños oligómeros (dímeros-tetrámeros) o capsómeros), que, después de la expresión, asume una estructura conformacional que presenta uno o más epítipos conformacionales HPV L1 que se encuentran en las cápsides virales originales o VLP y que es apropiada para el ensamblaje en VLP. En la presente invención, una proteína HPV L1 correctamente plegada presentará uno o más epítipos conformacionales HPV L1.

60 *Epítipo L1 HPV conformacional*: Un epítipo que se expresa en la superficie de la proteína L1 correctamente plegada, que se expresa también mediante una proteína L1 o fragmento, o su forma mutada, que también se expresa mediante una proteína L1 de un HPV correspondiente de tipo salvaje e infeccioso. Es bien aceptado por los expertos en la materia que la presentación de los epítipos conformacionales es esencial para la eficacia (tanto agentes profilácticos como diagnósticos) de los inmunógenos proteicos HPV L1.

65 *Epítipo L1 HPV conformacional neutralizante*: Un epítipo que se expresa en la superficie de la proteína L1 plegada correctamente plegada, de su fragmento o forma mutada, que se expresa también mediante una proteína L1 de un HPV correspondiente de tipo salvaje e infeccioso, y que produce anticuerpos neutralizantes. Es bien aceptado por los expertos en la materia que la presentación de los epítipos conformacionales neutralizantes es esencial para la eficacia (tanto agentes profilácticos como diagnósticos) de los inmunógenos proteicos HPV L1.

ES 2 317 910 T3

Anticuerpo conformacional: Un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo que se expresa como una proteína L1 correctamente plegada, pero no a una proteína L1 desnaturalizada.

5 *Proteína de la cápside viral fijada en acetona o alcohol:* Se refiere a una o más proteínas de la cápside viral, preferentemente de un virus sin envuelta, y de PV más preferentemente, que se precipita utilizando acetona o un alcohol, típicamente metanol, etanol, u otro alcohol inferior, y que se seca, por ejemplo, mediante un procedimiento de secado por aire, para producir un polvo que contiene proteínas estables de la cápside viral que presentan epítos-
10 pos de las proteínas originales de la cápside viral, preferentemente epítos neutralizantes, y que pueden guardarse durante períodos de tiempo prolongados bajo condiciones ambientales. El polvo resultante puede combinarse posteriormente con portadores, excipientes, adyuvantes, y ser administrado por las vías convencionales, por ejemplo, por vía inyectable.

15 *Bacterias fijadas en acetona o alcohol:* Se refiere a bacterias que se han tratado (fijado) con un alcohol (alcohol inferior, tal como metanol, etanol o butanol) o acetona, que expresan en su superficie, por lo menos, una proteína de la cápside viral, y que se secan transforman entonces en polvo mediante secado. El polvo resultante puede combinarse posteriormente con portadores, excipientes o adyuvantes convencionales, y administrarse por vías convencionales, por ejemplo, inyectables. Alternativa y preferentemente, el polvo se administra mediante aerosol o "soplado" (administrando) el polvo por el aire a través de la piel.

20 *Enterotoxina mutante:* Esto se refiere a formas mutantes de endotoxinas bacterianas, especialmente de la enterotoxina de *E.coli* lábil al calor, que han perdido su toxicidad pero conservaron la actividad inmunológica, y que son útiles como adyuvantes cuando se administran con otros antígenos especialmente en las vacunas orales. (Véase la patente US nº 6.019.982, publicada el 1 de febrero del 2000 por Clements y asignada a la University of Tulane).

25 *Capsómero:* esto se refiere a la mayor estructura de la cápside viral que constituye generalmente un polímero (formado por) uno o más tipos de las proteínas de la cápside. En el caso de PV, un capsómero original comprende un pentámero de las proteínas L1 de la cápside.

30 *Cápside:* se refiere a la parte estructural de un virus, por ejemplo, PV, que está compuesto de capsómeros. En el caso de PV, la cápside viral está compuesta de 72 capsómeros.

La presente invención proporciona un procedimiento altamente eficiente para producir proteínas de la cápside viral con un gran rendimiento, que utiliza un esquema de purificación sencillo, equitativamente simple, que da lugar a
35 proteínas de la cápside viral que presentan epítos neutralizantes conformacionales apropiados, las cuales proteínas de la cápside viral pueden guardarse durante períodos de tiempo prolongados a temperatura ambiente, y que pueden administrarse mediante procedimientos de inyección por aire o aerosólicos, así como mediante procedimientos convencionales, que, por supuesto, incluyen la vía inyectable.

40 En una forma de realización preferida, tal como se pone como ejemplo en la presente memoria, la presente invención se utilizará para producir composiciones PV estables de proteínas de la cápside, es decir, proteínas PVL1 en forma fusionada o no, así como sus versiones truncadas, que conservan epítos conformacionales. Sin embargo, se anticipa que los procedimientos en la presente memoria pueden extrapolarse a otras proteínas de cápsides virales, especialmente a proteínas de cápsides de otros virus sin envoltura que son similares a los papilomavirus, o de virus con envuelta.

45 Tal como se ha expuesto anteriormente, aunque existen varias vacunas de proteínas L1 que están siendo ensayadas clínicamente, el coste de estas preparaciones es muy caro por una o más de las razones siguientes:

- 50 (1) la producción requiere típicamente la utilización de gradientes de cloruro de cesio para la purificación de partículas de tipo vírico.
- (2) las partículas de tipo vírico tienden a ser inherentemente inestables, y, por lo tanto, deben conservarse en estado de congelación, para prevenir el desensamblaje.
- 55 (3) la producción de partículas L1 de tipo vírico se lleva a cabo típicamente en sistemas de baculovirus o de levaduras, que son generalmente más expresivos o es más difícil trabajar con ellos que con los sistemas de expresión bacterianos;
- 60 (4) las preparaciones de VLP están contaminadas frecuentemente con ácidos nucleicos y otras proteínas.

Los presentes inventores han desarrollado un procedimiento de expresión y purificación que obviará la totalidad de estos problemas y obstáculos.

65 En un aspecto, la presente invención se refiere a la expresión de una proteína de la cápside viral, preferentemente de un virus sin envuelta, y más preferentemente de una proteína L1 de la cápside del papilomavirus, o de un fragmento suyo como una proteína de fusión glutatión-S transferasa (GST). La proteína GST puede fusionarse al terminal amino o en la parte carboxilo terminal de la proteína de la cápside viral o de un fragmento suyo. En formas de realización preferidas, la proteína GST se fusiona con el extremo amino de una proteína PV L1 intacta o carboxi-truncada.

ES 2 317 910 T3

Sin embargo, se plantea la hipótesis de que la fusión al terminal carboxilo o a los fragmentos L1 amino truncados producirá también proteínas de la cápside que expresen uno o varios epítomos conformacionales, preferentemente neutralizantes.

5 La fusión de GST a las proteínas de la cápside viral, tales como las proteínas PVL1, es ventajosa, porque el producto de expresión puede purificarse fácilmente mediante cromatografía de glutatión sepharosa. Por lo menos, en el caso de las fusiones GST-COPV L1, se ha mostrado que la proteína de fusión resultante da lugar a pentámeros (capsómeros) que no se ensamblan, *in vitro*, en estructuras de orden superior (VLP). Se plantea la hipótesis de que el autoensamblaje en VLP no tiene lugar a causa de que la fusión de la proteína GST al extremo amino puede bloquear
10 residuos contenidos en la parte amino terminal de la proteína PVL1, lo que puede ser crítico para la formación de VPL, o porque la proteína L1 está truncada en el extremo carboxilo. De acuerdo con esto, es posible que, si la proteína GST se fusiona alternativamente en el extremo carboxilo de la proteína PVL1, puede tener lugar el ensamblaje en estructuras de orden superior, incluyendo VLPS.

15 Como los capsómeros que expresan epítomos conformacionales pueden ser superiores a VLP en el contexto de la preparación vacunal (por ejemplo, debido a su pequeño tamaño que puede facilitar la administración *in vivo*), puede preferirse fusionar la proteína GST, más que al extremo carboxilo, a la proteína amino terminal de la proteína L1. Sin embargo, esto no es crítico para la presente invención, constituye una selección arbitraria de diseño si la proteína o fragmento particular de la cápside viral se fusiona a GST en su extremo amino o carboxilo.

20 Otro aspecto de la invención (no forma parte de las reivindicaciones) se refiere a nuevas formas estables de proteínas de la cápside viral. En particular, la presente invención proporciona nuevas proteínas de la cápside viral fijadas en acetona o en alcohol, o células microbianas intactas fijadas en acetona o alcohol, preferentemente bacterias, y más preferentemente, *E. coli*, que expresa, por lo menos, una proteína de la cápside en su superficie. La fijación comprende
25 esencialmente la adición del disolvente acetona o alcohol (por ejemplo, metanol), típicamente bajo condiciones de frío, para producir una proteína de la cápside o una precipitación microbiana total, que se seca entonces, (dando lugar a un material) con una consistencia de tipo pulverulento. Se ha demostrado, en el caso de la proteína COPV L1 de la cápside, que tanto las proteínas COPV de la cápside fijadas en acetona, como la *E. coli* intacta fijada en acetona (que expresa COPVL1), presentan epítomos conformacionales neutralizantes, cuando son reconstituidas posteriormente en un transformador (solución tamponada de fosfato). Estos resultados indican que el procedimiento de fijación conserva
30 la auténtica estructura proteica de la cápside viral, por lo menos hasta el punto de que algunos (y potencialmente todos) los epítomos conformacionales y neutralizantes son preservados.

Este descubrimiento no tiene precedentes en el contexto del desarrollo vacunal, así como en las aplicaciones diagnósticas, ya que la presente invención proporciona un procedimiento de ensayo fácil y relativamente rápido para
35 producir proteínas de la cápside viral que conservan substancialmente la auténtica estructura (original) de la proteína de la cápside viral. Además, en el caso de los microbios intactos y fijados, el procedimiento es incluso más práctico, pues elimina la necesidad de recuperar la proteína de la cápside a partir de los microbios, por ejemplo, *E. coli*. Esto es particularmente apropiado en los contextos veterinarios.

40 Sin embargo, puede incluso ser apropiado en el contexto de las vacunas humanas, pues se conocen procedimientos para inactivar las enterotoxinas bacterianas, por ejemplo, mediante mutagénesis. De hecho, se ha informado de la utilización de dichas enterotoxinas mutadas como adyuvantes, y constituye el objeto de diversas patentes asignadas a la University Tulane.

45 Los ejemplos de virus que contienen proteínas de la cápside que pueden estar fijadas en acetona o alcohol, incluyen virus con envuelta o sin envuelta. Preferentemente, dichos virus incluirán papovavirus, virus Jc, y otros; rotavirus y orbivirus, reovirus, picornavirus, (por ejemplo, polio, hepatitis A, coxsackievirus, enterovirus, rinovirus), parvovirus, adenovirus, hepadnavirus, calcivirus, HIV, y otros retrovirus, y virus prototipo tales como VSV y virus de la rabia. Esta lista se proporciona a título de ejemplo no limitativo, y no ser exhaustiva de las proteínas de la cápside viral que
50 pueden tratarse (fijarse) según la invención.

Asimismo, aunque la invención se refiere preferentemente a las proteínas de la cápside viral fijadas en acetona o en alcohol, la técnica deberá ser aplicable para la fijación de otras proteínas virales, por ejemplo, proteasas, y otras
55 enzimas virales, tales como transcriptasas, polimerasas, y otras quinasas.

La forma por la que se obtiene la fijación mediante acetona o alcohol puede variar dentro de amplios límites. Todo lo que se necesita es la adición de una cantidad suficiente del disolvente acetona o alcohol, por ejemplo, un alcohol inferior tal como metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, para dar lugar a la precipitación de VLP o de las
60 células microbianas que constituyen los microbios, que pueden secarse para producir un polvo que contiene VLP o las células microbianas que expresan VLP, de una forma en la cual puede almacenarse durante períodos prolongados bajo condiciones ambientales. Esto constituye una ventaja significativa, pues permitirá que los materiales sean enviados a los Países del Tercer Mundo, que de otro modo no pueden tener capacidades adecuadas de almacenamiento.

65 Tal como se ha expuesto, la presente invención es aplicable para producir proteínas de la cápside viral para distintos virus, especialmente papilomavirus y, en particular, cualquier papilomavirus humano. En la literatura, se ha informado de muchos HPV L1 y L2 ADN y están públicamente disponibles. (Véase, por ejemplo, Baker, Análisis Secuencial de Papilomavirus, Genomes, págs 321-384; Long *et al*, patente US n° 5.437.931, Cole *et al.*, J. Mol. Biology., 193:

ES 2 317 910 T3

599-608 (1987); Danos *et al.*, EMBO J., 1: 231-236 (1982); Cole *et al* J. Virol., 38 (3):991-995 (1986). También, es bien conocido que HPVL1 ADN exhiben una homología significativa. Por tanto, un HPVL1 ADN puede obtenerse fácilmente, por ejemplo, mediante la utilización de un HPVL1 ADN del que se ha informado previamente o de un fragmento suyo como una sonda de hibridización o como un iniciador durante la amplificación mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR). Verdaderamente, se han clonado y expresado numerosos HPV L1 ADN.

Preferentemente, el HPVL1 ADN del que se habla se derivará a partir de un HPV que está implicado en el cáncer o en los condilomas acuminados, por ejemplo, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, y HPV-56 están implicados en el cáncer, y HPV-6, HPV-11, HPV-30, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-55, y HPV-70, están implicados en las verrugas. Sin embargo, las proteínas objeto de las cápsides pueden producirse utilizando cualquier HPVL1 ADN.

Tal como se ha indicado, el ADN de la proteína objeto de la cápside o su fragmento, fusionado o no, se expresará preferentemente en un huésped microbiano procariótico, por ejemplo, bacterias tales como *E. coli*, que pueden cultivarse bajo condiciones que favorecen la producción de proteínas de las cápsides. Esto dependerá en gran manera del sistema del huésped seleccionado y de las secuencias reguladoras que se contienen en el vector, por ejemplo, si la expresión de la proteína de la cápside requiere inducción.

Las secuencias HPV L1 u otros ADN de las proteínas de la cápside pueden expresarse en cualquier célula huésped que proporcione la expresión de rendimientos recuperables de la proteína de la cápside con una conformación apropiada. Los sistemas de huéspedes apropiados para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidos, e incluyen, como ejemplo, bacterias, células de mamíferos, levaduras, y células de insectos. Un sistema preferido de expresión comprende el sistema de expresión de *E. coli* que se utiliza en los Ejemplos, ya que este sistema proporciona altos rendimientos capsoméricos. Sin embargo, las proteínas HPVL1 y L2, así como otras proteínas de cápsides virales, pueden producirse en otros sistemas.

Los vectores apropiados para la clonación de la expresión de las secuencias del ADN que codifican la HPV L1 objeto, son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Además, son también bien conocidas secuencias reguladoras apropiadas para obtener la clonación y expresión, por ejemplo, promotores, secuencias de poliadenilación, potenciadores y marcadores seleccionables. La selección de secuencias apropiadas para obtener rendimientos proteicos recuperables resulta evidente para el experto en la materia.

Las proteínas de la cápside viral y los capsómeros tienen aplicación en vacunas profilácticas y en diagnósticos. Los capsómeros PV del objeto pueden ser ventajosos, a causa de su homogeneidad y estabilidad.

Tal como se ha considerado, la presente invención será ampliamente aplicable a cualquier secuencia HPVL1. Asimismo, en el aspecto de fijación en acetona o alcohol, los procedimientos del objeto (de la invención) son potencialmente aplicables a cualquier proteína de la cápside viral, o a microbios que expresen dicha proteína de la cápside. Tal como se ha considerado previamente, existen diversos tipos HPV conocidos en la técnica. Además, tipos particulares de HPVs se asocian con infecciones particulares, tales como verrugas planas, epidermodisplasia verruciforme, lesiones y cáncer cervical. Se han identificado aproximadamente de sesenta distintos tipos de HPV en lesiones clínicas mediante estudios de la homología de secuencias nucleótidas virales. Véase, por ejemplo, Jenson *et al.*, en: Belshe, R, editores, Libro de Texto de Virología Humana, 2ª edición, MASS:PSG, 1989:-951, y Kremsdorf *et al*, J. Virol., 52:1013-1018 (1984). El tipo de HPV determina, en parte, el sitio de la infección, las características patológicas y el aspecto clínico, así como el curso clínico de la lesión respectiva.

A causa de que se cree que existe poca o no existe inmunidad cruzada para los tipos de HPV y de que la inmunidad para la infección es específica del tipo de HPV, será necesario producir proteínas HPVL1 recombinantes de la cápside para cada tipo específico HPV, sobre el cual son necesarios protección o tratamiento. Sin embargo, debido a la homología entre las proteínas L1 y los genes, pueden utilizarse las técnicas de hibridización para aislar el gen L1 particular de interés. Las sondas nucleótidas seleccionadas de las regiones de la proteína L1 que se ha demostrado que muestran la homología secuencial, pueden utilizarse para aislar otros genes L1. Los procedimientos para la hibridización son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Nucleic Acid Hybridization. A practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985); Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Maniatis *et al*, editores, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982); y Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, editores, Cold Spring Harbor Laboratory, 2ª edición, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Alternativamente, pueden utilizarse procedimientos PCR para amplificar los genes L1 o los fragmentos génicos. (Véase, por ejemplo, patentes US nº 4.683.195; nº 4.683.202; y nº 4.800.159).

Las partículas víricas pueden aislarse también para un tipo particular de papilomavirus, clonar el ADN y aislar las secuencias ácido nucleicas que codifican las proteínas L1. Se ha informado de procedimientos para el aislamiento de las partículas virales y para la clonación de los ADN víricos (Véase, por ejemplo, Hellman *et al*, J. Virology, 36:395-407 (1980); Beaudenon *et al*, Nature, 321:246-249 (1986); Georges *et al*, J. Virology, 51:530-538 (1984); Kremsdorf *et al*, J. Virology, 52:1013-1018 (1984); Clad *et al*, Virology, 118:254-259 (1982); DeVilliers *et al*, J. Virology, 40:932-935 (1981), y la Solicitud de Patente Europea 0.133.123)).

Alternativamente, puede aislarse la proteína L1 para un papilomavirus humano particular, determinarse la secuencia aminoácida y construyéndose las sondas ácido nucleicas basándose en la secuencia predicha del ADN. Dichas

ES 2 317 910 T3

sondas pueden utilizarse para aislar el gen L1 a partir de una biblioteca del ADN del papilomavirus. (Véase, por ejemplo, Suggs *et al.*, PNAS, 78(11):6613-6617 (1981) y Young y Davis, PNAS, 80:1194 (1983)).

5 En el aspecto de la fijación con acetona o alcohol, es posible utilizar vectores baculavirus para la expresión. Los sistemas de baculavirus ofrecen la ventaja de que un alto porcentaje de células pueden ser inducidas para expresar proteínas, debido a la utilización de la infección, más que a las técnicas de transfección. Aunque el baculovirus es un virus de insectos y se desarrolla en células de éstos (Sf9), estas células conservan muchos de los mecanismos eucarióticos para el procesamiento de las proteínas, incluyendo la glicosilación y la fosforilación, que pueden ser importantes para generar proteínas de una conformación apropiada. Los sistemas vectoriales de baculovirus son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experimental Bulletin n° 1555 (1987), Smith *et al.*, Mol. Cell Biol., 3:2156-2165 (1985); Posse, Virus Research, 5: 4359 (1986); y Matsuura, J. Gen. Virol., 68:1233-1250 (1987). También se ha informado de que las células infectadas con baculovirus expresan las proteínas HPV L1 exhibiendo la conformación apropiada. Sin embargo, por las razones anteriormente identificadas, la expresión bacteriana y, más preferentemente, resulta preferida la expresión en *E. coli* de una proteína de fusión GST-L1.

15 Para la expresión en un sistema apropiado de expresión, un gen L1 o un gen L1 modificado se une operativamente a un vector de expresión y se introduce en una célula huésped, para permitir la expresión de la proteína L1 por esta célula. El gen con las apropiadas regiones reguladoras se suministrará en la orientación apropiada y con el marco de lectura para permitir la expresión. En la técnica, se conocen procedimientos para la construcción génica. (Véase, en particular Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, editores, Cold Spring Harbor Laboratory, 2ª edición, Cold Spring Harbor, NY (1989)), y las referencias que se citan en este texto).

20 Puede utilizarse una amplia variedad de secuencias transcripcionales y reguladoras. Las señales pueden derivarse de orígenes virales, si las señales reguladoras se asocian con un gen particular que tenga un alto nivel de expresión. Es decir, los promotores intensos, por ejemplo, promotores intensos de mamíferos, virales o bacterianos, pueden utilizarse. De este modo, las condiciones óptimas para llevar a cabo la invención incluyen la clonación del gen L1 en un vector de expresión que sobreexpresará epítopos conformacionalmente-virus dependientes-neutralizantes de la proteína L1 en células diana infectadas o transfectadas (*E. coli*).

30 La apropiabilidad de las proteínas de las cápsides virales, preferentemente de las proteínas de las cápsides de HPV, producidas según la invención para su utilización como vacunas o como agentes diagnósticos, puede confirmarse mediante reacción con anticuerpos o anticuerpos monoclonales que reaccionan o reconocen epítopos conformacionales que se encuentran en el virión intacto y que se basan en su capacidad para provocar la producción de antisuero neutralizante. Los ensayos apropiados para determinar si se producen anticuerpos neutralizantes son conocidos por los expertos en la materia. Ésta constituye una característica esencial de las proteínas de la cápside del HPV o de otras proteínas de la cápside viral que tienen que utilizarse en las vacunas del HPV o de otros virus. De esta forma, puede comprobarse si las proteínas de la cápside del HPV provocarán la producción de anticuerpos anti-HPV neutralizantes. De este modo, pueden ensayarse otros sistemas de expresión y de vectores de expresión para utilizarlos en la invención.

40 Tal como se expuso, las proteínas de la cápside y sus formas estables producidas según la presente invención, pueden utilizarse para detectar, diagnosticar, serotipar y tratar la infección por papilomavirus. Cuando se utilizan para el diagnóstico o el serotipado, las proteínas de la cápside, por ejemplo, las proteínas de la cápside del HPV producidas según la invención, pueden marcarse utilizando cualquiera de los diversos marcadores y de los procedimientos de marcaje que existen. Los ejemplos de tipos de marcadores que pueden utilizarse en la presente invención incluyen pero no se limitan a marcadores enzimáticos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos no radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores tóxicos, y marcadores quimioluminiscentes.

50 Los ejemplos de marcadores enzimáticos apropiados incluyen malato hidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide-isomerasa, alcohol deshidrogenasa de la levadura, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, etc.

55 Ejemplos de marcadores radioisotópicos apropiados incluyen ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , y ^{109}Pd .

Los ejemplos de marcadores fluorescentes apropiados incluyen un marcador ^{152}Eu , un marcador de fluoresceína, un marcador de isotiocianato, un marcador de rodamina, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de alofocianina, un marcador de o-ftaldehído, un marcador de fluorescamina, etc.

60 Los ejemplos de marcadores tóxicos apropiados incluyen la toxina diftérica, ricina y toxina colérica. Los ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador de luminal, un marcador de isoluminal, un marcador del éster aromático de acridinio, un marcador imidazólico, un marcador de la sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa, un marcador de aequorina, etc.

65 Los expertos en la materia conocerán otros marcadores apropiados que pueden utilizarse según la presente invención. La unión de estos marcadores a las proteínas de las cápsides virales, por ejemplo, en forma de capsómeros, puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándares conocidas habitualmente por los expertos en la materia. Las técnicas típicas se describen por Kennedy *et al.*, Clin. Chim. Acta, 70:1-31 (1976) y Schurs *et al.*, Clin. Chim. Acta, 81:1-40

(1977). Las técnicas de acoplamiento que se mencionan en estas últimas son el procedimiento del glutaraldehído, el procedimiento del peryodato, el procedimiento de la dimaleimida, el procedimiento del éster de la m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinamida, la totalidad de cuyos procedimientos se incorpora como referencia en la presente memoria.

5 La detección de los anticuerpos anti-HPV utilizando las proteínas objeto de la cápside puede mejorarse mediante la utilización de portadores. Los portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestirenos, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble en algún grado o insoluble para los propósitos de la presente invención. Los expertos en la materia considerarán muchos otros portadores apropiados para las proteínas de unión, o podrán determinar los mismos
10 utilizando la experimentación rutinaria.

El aspecto más importante de la presente invención, sin embargo, implica el desarrollo de vacunas virales, preferentemente de vacunas PV. Las vacunas de la invención contendrán una cantidad de las proteínas objeto (de la invención) de la cápside viral, por ejemplo, una forma fijada en acetona o en alcohol, suficiente para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes en el huésped contenido en un portador farmacéuticamente aceptable.
15

La administración de las vacunas que contienen proteínas objeto (de la invención) de la cápsula, puede llevarse a cabo mediante cualquier medio farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, parental, local o sistémicamente, incluyendo por ejemplo, la administración oral, intranasal, intravenosa, intramuscular y tópica. La forma de administración está afectada por factores que incluyen la vía natural de la infección. Tal como se considera en el caso de proteínas de la cápside fijadas en acetona o alcohol, la vía preferida de administración es "soplando" a través de la piel utilizando un aerosol. La dosis administrada dependerá de factores que incluyen edad, salud, peso, tipo de tratamiento concomitante si existe, y naturaleza y tipo del virus particular, por ejemplo, el papilomavirus humano. La vacuna puede utilizarse en una forma de dosificación tal como cápsulas, soluciones líquidas, suspensiones, o elixires, para administración oral,
20 o formulaciones líquidas estériles tales como soluciones o suspensiones para uso parenteral o intranasal. Se utiliza preferentemente un portador inerte, inmunológicamente aceptable tal como una solución salina o una solución salina tamponada de fosfato.
25

Las vacunas se administrarán en cantidades terapéuticamente efectivas. Es decir, en cantidades suficientes para producir una respuesta inmunológica protectora. Generalmente, las vacunas se administrarán en dosis del orden de 0,1 mg de proteínas aproximadamente a 20 mg de proteínas aproximadamente, más generalmente del orden de 0,001 mg a 100 mg de proteínas aproximadamente. Pueden administrarse dosis únicas o múltiples.
30

Tal como se ha considerado, la invención se refiere además a la producción de fragmentos de proteínas de la cápside que después de la expresión presentan epítomos conformacionales neutralizantes. Estos fragmentos incluirán deleciones internas, carboxi y aminoterminal. La deleción puede ser de un tamaño del orden de 1 a 100 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 50 aminoácidos, y muy preferentemente de aproximadamente 1 a 25 aminoácidos. Es esencial que la deleción permita todavía la expresión de una proteína de la cápside, por ejemplo, la proteína HPV L1, que cuando se exprese en forma fusionada o no, presente por lo menos un epítomo conformacional neutralizante.
35
40

El procedimiento de la presente invención hace posible la preparación de vacunas que contengan proteínas de la cápside, por ejemplo, vacunas que contengan proteínas de la cápside del HPV, apropiadas para prevenir la infección viral, por ejemplo, la infección PV. Siguiendo los procedimientos de la invención, pueden prepararse vacunas para cualquiera de los papilomavirus específicos humanos.
45

Como con las infecciones PV puede asociarse más de un tipo PV, las vacunas pueden incluir proteínas estables de la cápside del HPV derivadas de más de un tipo de PV. Por ejemplo, como los HPV 16 y 18 se asocian con cánceres cervicales, una vacuna para la neoplasia cervical puede comprender, por tanto, VLP de HPV 16; o de HPV 18; o de ambos, HPV 16 y HPV 18.
50

De hecho, es conocido que una variedad de neoplasia se asocia con infecciones PV. Por ejemplo, los HPVs 3a y 10 se han asociado con verrugas planas. Se ha informado de que diversos tipos de HPV se han asociado con la epidermodisplasia verruciforme (EV), incluyendo HPVs 3a, 5, 8, 9, 10 y 12. Se ha informado de que los HPVs 1, 2, 4 y 7 se han asociado con verrugas cutáneas y los HPVs 6b, 11a, 13, y 16 se asocian con lesiones de las membranas mucosas (véase, por ejemplo, Kremendorf *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) y DeVilliers *et al.*, J. Virol., 40:932-935 (1981)). Así, las formulaciones vacunales objeto de la invención pueden comprender una mezcla de proteínas de la cápside o de fragmentos derivados de distintos tipos de HPV, dependiendo de la protección que se desee.
55

Tal como se ha indicado, las proteínas de la cápside del HPV de la invención pueden también utilizarse para el serotipado y para la incorporación en kits de serotipado.
60

Para ensayos serológicos, los equipos comprenderán las proteínas del objeto (de la invención) de la cápside viral y medios para la detección, tales como substratos enzimáticos, anticuerpos marcados y similares.
65

Habiendo descrito ahora de forma general la invención, los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo no limitativo, sin tener la intención de ser limitantes, si no se especifica lo contrario.

ES 2 317 910 T3

Ejemplo 1

Se expresó una proteína de fusión COPV GST L1 utilizando el vector pGEX-4T-2 disponible a partir de Pharmacia Biotech en *E. coli*. En la Figura 1 se contiene un constructo de ADN que se utilizó. Esencialmente, una proteína COPV L1 a la que faltaban 26 aminoácidos en la parte carboxiterminal de la proteína L1 se fusionó en su extremo amino con una proteína marcadora glutatión-S-transferasa (GST). La presencia del marcador GST es ventajoso, pues permite que las proteínas de fusión resultantes sean recuperadas mediante cromatografía de afinidad.

Esto se llevó a cabo utilizando una columna de afinidad que une específicamente la proteína GST (columna de glutatión sepharosa). Durante la purificación, se observa que la proteína GST COPV L1 está asociada con la proteína Gro EL bacteriana. De acuerdo con esto, se llevaron a cabo una serie de pasos para disociar la proteína Gro EL bacteriana de la proteína GST L1 de fusión.

Sin embargo, deberá considerarse que las condiciones de este procedimiento de purificación no son esenciales para la invención. De hecho, la proteína GST-L1 se recuperó a partir de la columna bajo condiciones que fueron completamente severas. Por ejemplo, el procedimiento de purificación incluía dos etapas no desnaturizantes de elución de la urea, en el que la columna de afinidad se lavó con urea. Los inventores anticipan que la purificación y la recuperación podrá efectuarse bajo condiciones menos severas, mediante la optimización rutinaria del proceso de purificación, utilizando, por ejemplo, distintos agentes de elución, o condiciones de pH. Verdaderamente, este procedimiento de purificación constituye meramente un ejemplo de los procedimientos de purificación que pueden utilizarse. Sin embargo, demuestra que a partir de *E. coli* pueden obtenerse capsómeros COPV GST-L1 eficaces (protectores).

Cuando se examinaron mediante microscopía electrónica, se apreció que las proteínas de fusión GST-L1 se encontraban presentes como pentámeros que no se autoensamblaban *in vitro* en estructuras de orden superior. Se especula que el ensamblaje puede no llevarse a cabo debido a que los residuos aminoácidos en los extremos amino de la proteína COPV L1 pueden estar implicados en el ensamblaje de las estructuras VLP, o a causa del hecho de que la proteína L1 expresada estaba truncada en el extremo carboxilo.

Ejemplo 2

Reactividad de la fusión GST-L1 con anticuerpos lineales

Se ensayó la reactividad de la fusión COPV L1-GST con anticuerpos lineales. Tal como se muestra en la Figura 2, los capsómeros GST-L1 purificados reaccionaron con un anticuerpo (anti-Av 1 Ab) a un (epítipo no conformacional) lineal. Por tanto, los resultados de ELISA en la Figura 2 indican que la proteína de fusión GST-L1 expresa epítipos no conformacionales, que no se encuentran en el virus intacto completo.

Ejemplo 3

Asimismo, se determinó si la proteína de fusión GST-L1 reaccionaba con anticuerpos monoclonales conformacionales específicos para epítipos conformacionales sobre la proteína COPV L1. Tal como se muestra en la Figura 3, se encontró sorprendentemente que la fusión GST-COPV L1 reaccionara con un anticuerpo producido contra la proteína COPV L1 intacta (conformacionalmente correcta). Tal como se esperaba, y como puede apreciarse a partir de los resultados ELISA, el control positivo, es decir, el virus COPV intacto, reaccionó también con los anticuerpos anti-COPV intacto. De este modo, la fusión GST-L1 expresa aparentemente tanto los epítipos lineales como los no conformacionales. La presencia de epítipos lineales puede atribuirse al procedimiento de purificación, que incluye dos procedimientos de lavado de la urea que pueden conducir a alguna desnaturización proteica.

Ejemplo 4

Pureza de la fusión COPV GST-L1

Tal como se muestra en la Figura 4, cuando las proteínas COPV GST-L1 y COPV L1 se aplicaron a una columna electroforética SDS-gel, se encontraron predominantemente como una banda única. Sin embargo, como puede apreciarse en la figura, existió una ligera contaminación en la composición GST-L1. Basándose en estos resultados, parecería que la fusión GST-L1 purificada mediante afinidad, es relativamente homogénea.

Ejemplo 5

Utilización de la fusión GST-COPV L1 como un inmunógeno

Tal como se muestra por los resultados en la Figura 5, la administración de la fusión GST-L1 contenida en la solución salina tamponada de fosfato (PBS) a una dosis de 1 μg , dio lugar a una protección completa en perros sabuesos después de estimulación. Estos resultados son verdaderamente inesperados y proporcionan una evidencia convincente de que las proteínas de fusión GST-L1 son apropiadas para usarlas en las composiciones vacunales PV.

ES 2 317 910 T3

Ejemplo 6

Se obtuvieron cantidades idénticas de la proteína de fusión GST-L1 purificada (contenida en PBS) que se utilizó en el Ejemplo previo. Se conservó una alícuota en hielo y la otra se precipitó utilizando acetona enfriada en hielo, secándose al aire el precipitado, y dando lugar a un polvo. El polvo resultante se volvió a solubilizar en el volumen original de PBS.

Entonces, mediante ELISA y con distintos anticuerpos conformacionales, se comparó la inmunorreactividad del polvo de acetona GST-L1 reconstituido, con respecto a la de la proteína GST-L1 original purificada. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la Figura 6, la proteína GST-L1 contenida en el polvo de acetona, conservó los epítomos conformacionales. Asimismo, *E. coli* intactas fijadas con acetona, se fusionaron también para reaccionar con dichos anticuerpos.

Estos resultados indican que es factible preparar polvos de GST-L1 purificadas fijados en acetona o en alcohol (o de otras proteínas de las cápsides virales de forma fusionada o no), o de bacterias que expresen L1 o fusiones GST-L1 o sus fragmentos, que presenten epítomos conformacionales. Estos polvos de acetona o de alcohol deberán “ajustarse” (adecuarse) para utilizarlos como vacunas virales profilácticas o protectoras, o como agentes diagnósticos, ya que deberán provocar o unirse específicamente a anticuerpos dirigidos contra epítomos conformacionales neutralizantes sobre la proteína auténtica de la cápside.

Tal como se ha considerado anteriormente, esto es ventajoso debido a varias razones. En primer lugar, los polvos de proteínas de la cápside fijados en acetona o alcohol, pueden conservarse bajo condiciones ambientales durante períodos prolongados de tiempo. Esto constituye un beneficio significativo, pues permitirá que las vacunas sean suministradas a países tercermundistas y que se guarden con un coste relativamente bajo. Por ejemplo, esta estrategia puede permitir la producción de otras vacunas proteicas de cápsides virales, estabilizadas con acetona, particularmente para otros virus que contengan proteínas en cápsides sin envuelta.

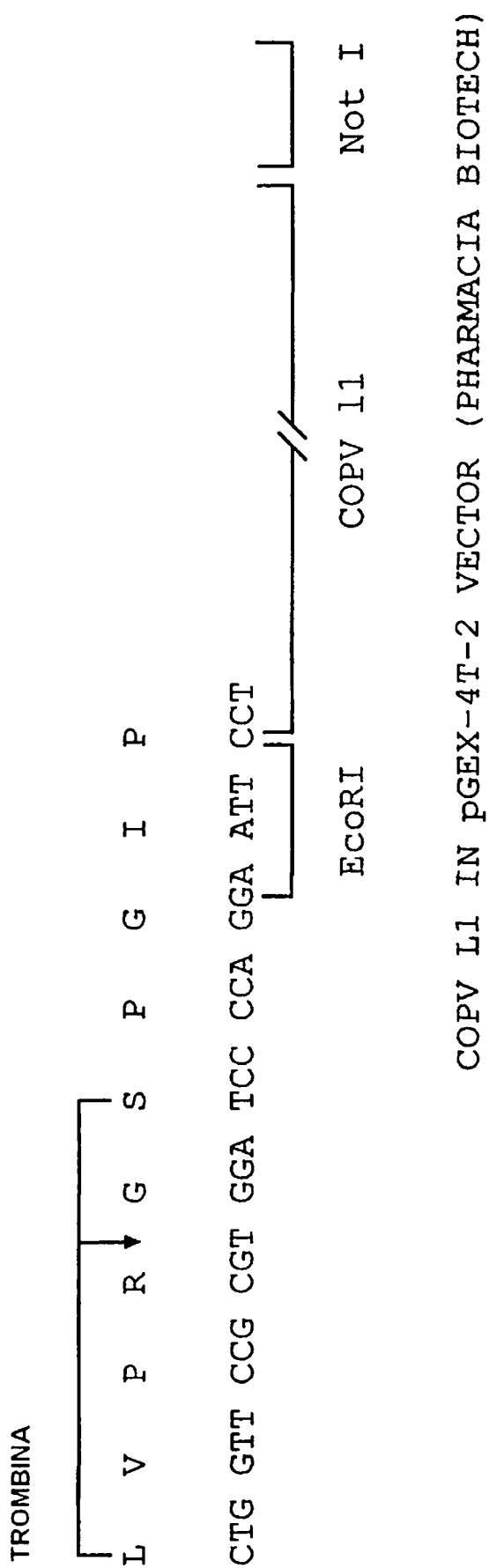
En segundo lugar, será ventajoso desde una perspectiva administrativa, porque las vacunas objeto de la invención, de polvos fijados en acetona o alcohol, pueden administrarse, por ejemplo, mediante inyección de aire, a través de la piel, o utilizando procedimientos aerosólicos. Están disponibles comercialmente dispositivos adecuados para “soplar” (o, mejor, introducir) dichos polvos a través de la piel. Para los receptores humanos, los inmunógenos fijados en acetona se producirán preferentemente mediante fijación de una proteína de la cápside viral, o un fragmento, de forma fusionada o no, por ejemplo, una fusión GST-L1, que se administra entonces al hombre, preferentemente mediante inyección de aire.

En el caso de receptores animales, la vacuna administrada puede comprender un polvo de acetona de la proteína purificada de la cápside, fusionada o no, o un polvo fijado en acetona o alcohol, producido a partir de bacterias intactas que expresen la proteína de la cápside, fusionada o no, que preferentemente haya sido tratada para neutralizar endotoxinas y otros contaminantes.

ES 2 317 910 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína de fusión que comprende una proteína L1 de la cápside de papilomavirus, o un fragmento de la misma, fusionada en su extremo amino o carboxilo a una proteína glutatión-S-transferasa (GST), en la que dicha proteína de fusión expresa por lo menos un epítipo conformacional expresado por una proteína nativa (de tipo salvaje) de la cápside de papilomavirus.
- 10 2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que dicha proteína GST está fusionada en el extremo amino de la proteína de la cápside.
3. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha proteína L1 de papilomavirus es una proteína L1 de papilomavirus humano o un fragmento de la misma.
- 15 4. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha proteína L1 es seleccionada de entre el grupo constituido por HPV-1, HPV-6, HPV-16, HPV-18, HPV-33, y HPV-35.
5. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se fija en acetona o en alcohol.
- 20 6. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 5, que comprende una proteína de fusión GST-COPV L1.
7. Secuencia ácido nucleica que codifica la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 8. Secuencia ácido nucleica que codifica la proteína de fusión según la reivindicación 6.
9. Vector de expresión o virus recombinante que proporciona la expresión de la secuencia ácido nucleica según la reivindicación 7.
- 30 10. Vector de expresión que proporciona la expresión de la secuencia ácido nucleica según la reivindicación 8.
11. Utilización de la proteína de fusión GST-PV L1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de la infección por papilomavirus.
- 35 12. Utilización de la proteína de fusión GST-PV L1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la inmunización de un receptor sensible contra un virus que exprese dicha proteína de la cápside viral.
- 40 13. Utilización según la reivindicación 12, en la que dicho medicamento se administra soplando dicho polvo a través de la piel, o mediante inyección de una vacuna que contiene dicho polvo de acetona.
- 45 14. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización como una vacuna profiláctica o terapéutica para conferir inmunidad contra las infecciones por papilomavirus.
- 50
- 55
- 60
- 65



COPV L1 IN pGEX-4T-2 VECTOR (PHARMACIA BIOTECH)

FIG. 1

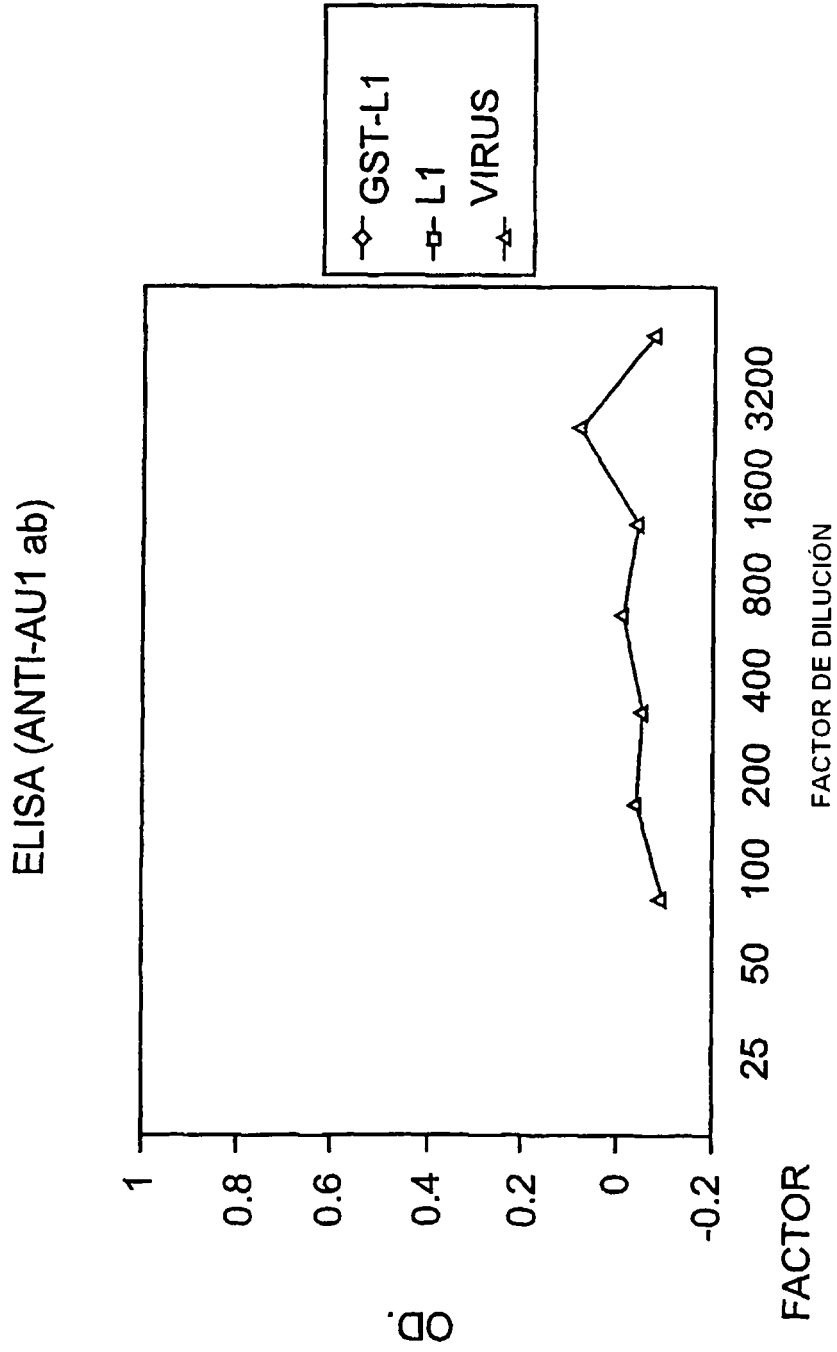


FIG. 2

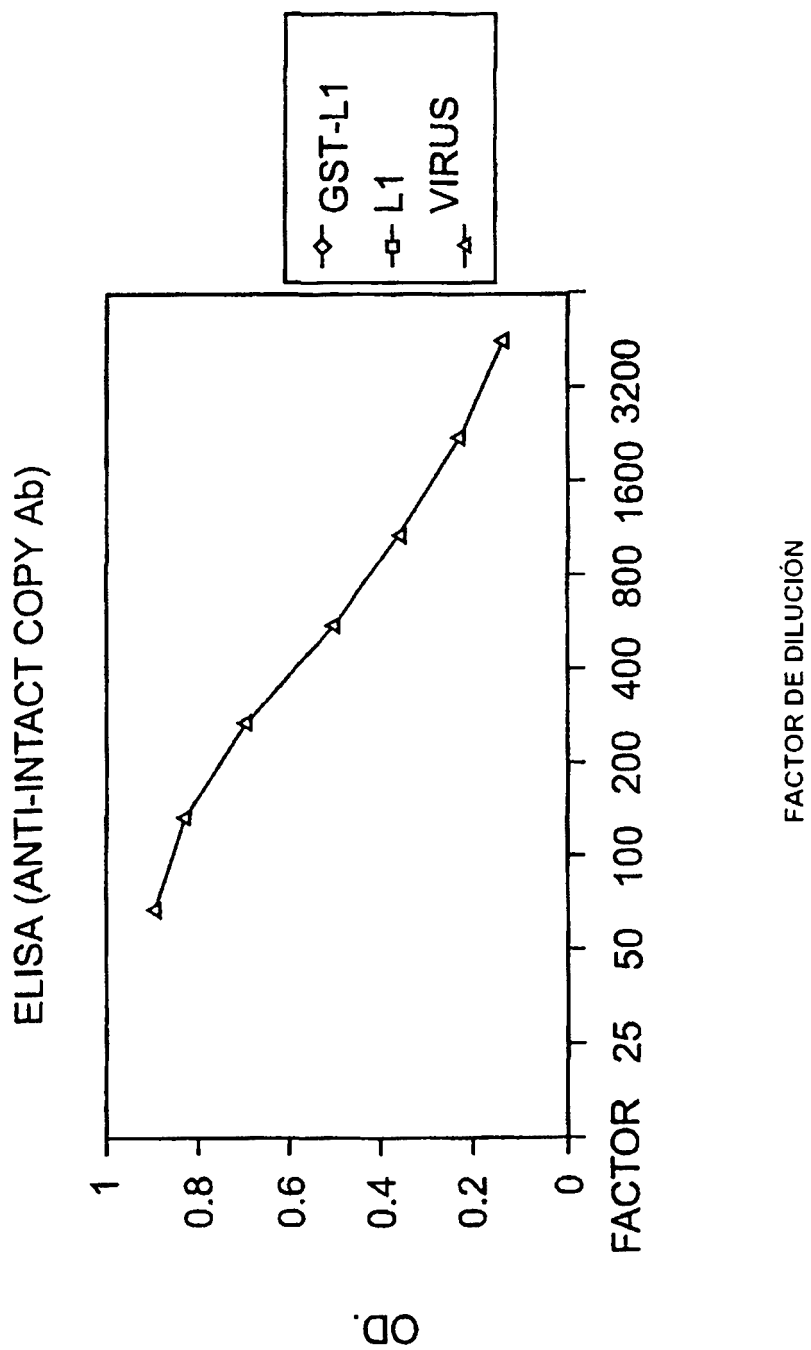


FIG. 3

ESTUDIO CON PERROS GST-L1		<u>TUMORES</u>
GROUP A	0 ng/ml	4/4
GROUP B	.125 ng/ml	4/4
GROUP C	2.5 ng/ml	4/4
GROUP D	50 ng/ml	4/4*
GROUP E	1,000 ng/ml	0/4
01/19/2000	VACUNA	
02/02/2000	VACUNA	
02/16/2000	ESTIMULO	

* PEQUEÑOS TUMORES

FIG. 5

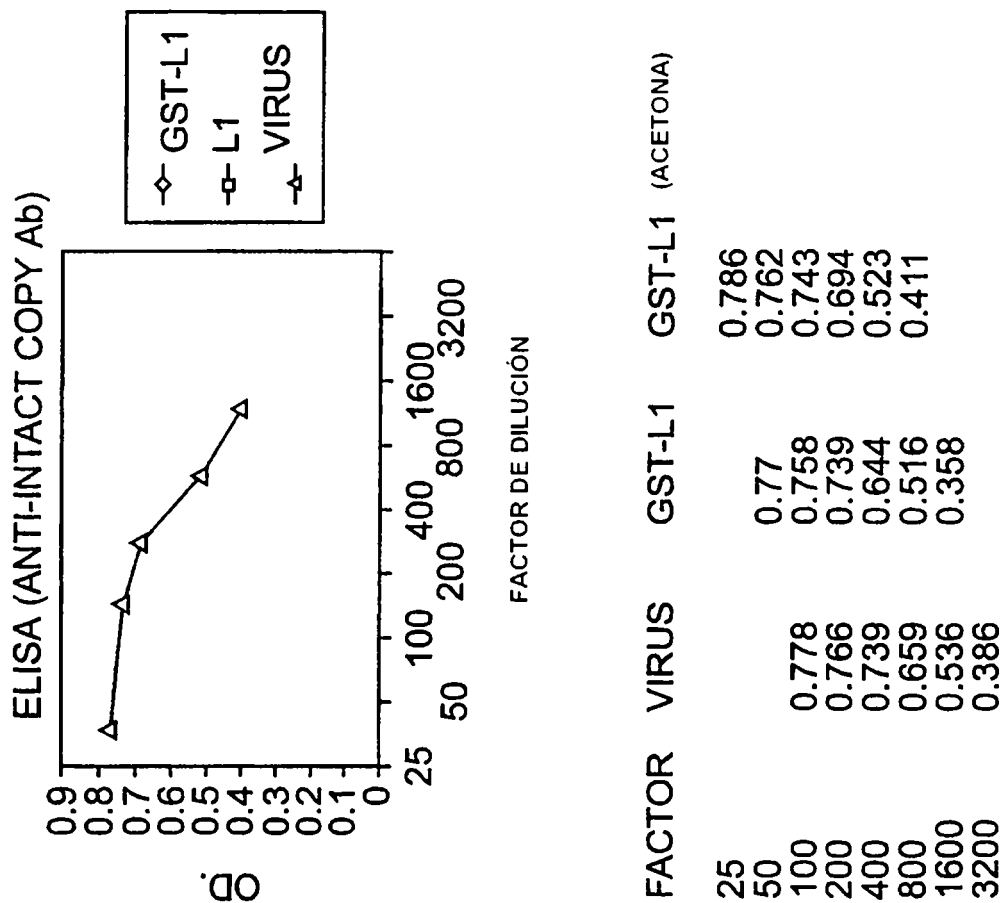
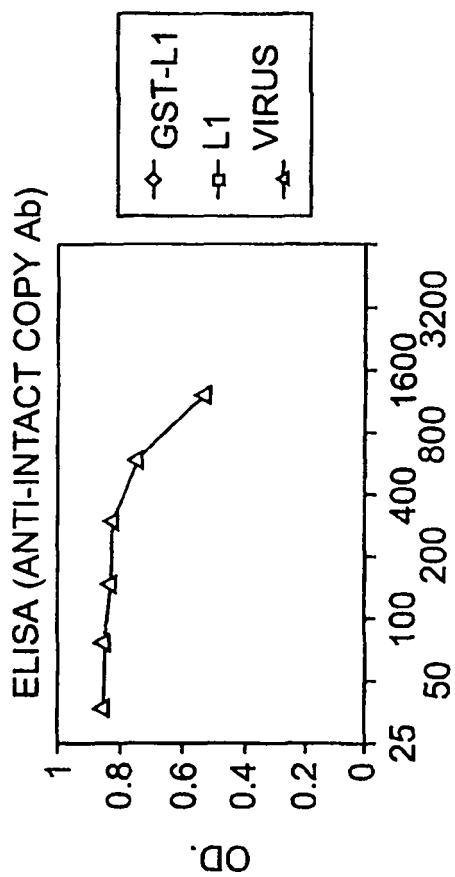


FIG. 6A



FACTOR DE DILUCIÓN

FACTOR	VIRUS	GST-L1	GST-L1 (ACETONA)
25			0.884
50		0.884	0.876
100	0.107	0.859	0.855
200	0.07	0.851	0.843
400	0.04	0.805	0.757
800	0.022	0.674	0.561
1600	0.038	0.515	
3200	0.021		

FIG. 6B