



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 551**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/37 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01942170 .0**

86 Fecha de presentación : **12.06.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1292328**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2003**

54 Título: **Moléculas L1 de papilomavirus humano (HPV) quiméricas y usos de las mismas.**

30 Prioridad: **21.06.2000 US 212839 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

73 Titular/es: **MEDIMMUNE, Inc.**
One Medimmune Way
Gaithersburg, Maryland 20878, US

72 Inventor/es: **Wilson, Susan;**
White, Wendy;
Suzich, JoAnn, A. y
Mullikin, Brian

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 301 551 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

Moléculas L1 de papilomavirus humano (HPV) quiméricas y usos de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona un medio para generar respuestas de anticuerpos neutralizantes de elevado título contra HPV 18 y HPV 45 y opcionalmente los tipos de papilomavirus humanos (HPV) con partículas tipo virus compuestas (VLP) de una molécula L1 quimérica que contiene epítomos neutralizantes de cada uno de los tipos de HPV. Estas VLP provocan respuestas de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto pueden usarse como reactivos profilácticos eficaces contra las patologías asociadas con infecciones prolongadas con los tipos de HPV. Las respuestas inmunes celulares contra la molécula L1 de HPV quimérica puede proporcionar efectos terapéuticos beneficiosos contra infecciones establecidas. Las VLP quiméricas también pueden ser útiles en el diagnóstico de una infección anterior o actual con los tipos de HPV o usarse como un auxiliar en la determinación del nivel de anticuerpo protector (neutralizante) presente en una muestra de fluido corporal. Además, la presente invención se refiere al uso de dichas VLP para la encapsulación de restos deseados, por ejemplo, agentes de diagnóstico o terapéuticos, y el uso de los mismos como "pseudoviriones" para evaluar la eficacia de vacunas putativas o agentes terapéuticos.

20 **Antecedentes de la invención**

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

En seres humanos, los papilomavirus causan verrugas genitales, una enfermedad de transmisión sexual frecuente. Los tipos de HPV 6 y 11 son los más habitualmente asociados con verrugas genitales benignas condilomata acuminata. Las verrugas genitales son muy comunes, y una infección por HPV subclínica o no evidente es incluso más común que una infección clínica. Aunque la mayoría de las lesiones inducidas por HPV son benignas, las lesiones que surgen de ciertos tipos de papilomavirus, por ejemplo, HPV-16 y HPV-18, pueden experimentar un progreso maligno. Además, la infección por uno de los tipos de papilomavirus asociados con malignidad se considera que es un factor de riesgo significativo en el desarrollo de cáncer cervical, el segundo cáncer más común en mujeres en el mundo. De los genotipos de HPV implicados en cáncer cervical, HPV-16 es el más común, encontrándose en aproximadamente el 50% de los cánceres cervicales. La prevalencia de HPV-18 varía de aproximadamente el 8-31% dependiendo de la localización geográfica, y en la mayoría de las áreas mundiales, HPV-45 es el tercero más frecuente, tipo HPV oncogénico (Bosch, F. X., *et al.* (1995, J. Natl. Cancer Inst. 87: 796-802).

En vista de los riesgos para la salud significativos planteados por una infección por papilomavirus en general, y la infección por papilomavirus humanos en particular, varios grupos han informado del desarrollo de antígenos de papilomavirus recombinantes y su uso como agentes de diagnóstico y como vacunas profilácticas. En general, dicha investigación se ha centrado en producir vacunas profilácticas que contengan la proteína principal de la cápsida (L1) sola o en combinación con la proteína minoritaria de la cápsida (L2). Por ejemplo, Guim *et al.*, *Virology*, 190:548-552 (1992), informaron de la expresión de proteína L1 de HPV-1, usando expresión de vaccinia en células Cos, que presentaban epítomos conformacionales y el uso de la misma como una vacuna o para la determinación del tipo serológico o detección. Este trabajo también es la base de una solicitud de patente, de Estados Unidos N° de Serie 07/903.109, presentada el 25 de junio de 1992 (abandonada en favor de la de Estados Unidos N° de Serie 08/216.506, presentada el 22 de marzo de 1994), que se ha licenciado por el cesionario de esta solicitud. Además, Suzich *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 92:11553-11557 (1995), informan de que la inmunización de caninos con un papilomavirus oral canino recombinante (COPV) expresado en un sistema de baculovirus/célula de insecto evitaba completamente el desarrollo de papilomas virales de la mucosa. Estos resultados son importantes dado las similitudes significativas entre muchos HPV y COPV. Por ejemplo, COPV, similar a HPV asociados con cáncer anogenital y genital, infecta e induce lesiones en un sitio de mucosa. Además, las secuencias de L1 de COPV comparten similitudes estructurales con secuencias de L1 de HPV. Dadas estas similitudes, el modelo de COPV/perro beagle es útil para la investigación de vacunas que contienen la proteína L1, por ejemplo, la investigación de la respuesta inmune protectora, protección de infección natural y optimización de protocolos de vacunación. (Id.)

Además, un grupo de investigación de la University of Rochester informó de la producción de la proteína principal de la cápsida (L1) de papilomavirus humanos y partículas tipo virus usando un sistema de expresión de baculovirus/célula de insecto (Rose *et al.*, University of Rochester, documento WO 94/20137, publicado el 15 de septiembre de 1994). En particular, informaron de la expresión de la proteína principal de la cápsida L1 de HPV-6 y HPV-11 y la producción de partículas tipo virus HPV-6, HPV-11, HPV-16 y HPV-18.

ES 2 301 551 T3

Además, un grupo de investigación de la University of Queensland también describió supuestamente la fabricación recombinante de proteínas L1 y/o L2 de papilomavirus y partículas tipo virus así como su uso potencial como vacunas (Frazer *et al*, documento WO 93/02189, publicado el 4 de febrero de 1993).

5 Además, un grupo de investigación del gobierno de los Estados Unidos informó de proteínas de la cápsida de papilomavirus recombinantes supuestamente capaces de auto-ensamblarse en estructuras de capsómero y cápsidas virales que comprenden epítomos antigénicos conformacionales (Patente de Estados Unidos N° 5.437.951, Lowy *et al*, expedida el 1 de agosto de 1995). Las reivindicaciones de esta patente se refieren a una secuencia de ADN de HPV-16 específica que codifica una proteína L1 capaz de auto-ensamblarse y el uso de la misma para expresar cápsidas de HPV-16 recombinantes que contienen dicha proteína L1 de HPV-16.

15 Con respecto a vacunas que contienen proteína de la cápsida de HPV, está ampliamente aceptado por los especialistas en la técnica que un pre-requisito necesario de una vacuna basada en la proteína principal de la cápsida L1 de HPV eficaz es que la proteína L1 presente epítomos conformacionales expresados por proteínas principales de la cápsida de papilomavirus humanos nativos (véase, por ejemplo, Hines *et al*, *Gynecologic Oncology*, 53:13-20 (1994); Suzich *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 92:11553-11557 (1995)).

20 Las proteínas L1 de HPV recombinantes tanto no de partícula como de partícula que presentan epítomos de L1 de HPV conformacionales nativos se han presentado en la bibliografía. Se sabe que L1 es estable en varias configuraciones oligoméricas, por ejemplo, (i) capsómeros que comprenden pentámeros de la proteína L1 y (ii) cápsidas que están constituidas por setenta y dos capsómeros en una estructura icosaédrica T=7. Además, se sabe que la proteína L1, cuando se expresa en células eucariotas por sí misma, o en combinación con L2, es capaz de auto-ensamblarse de forma eficaz en estructuras tipo cápsida generalmente conocidas como partículas tipo virus (VLP).

25 Se ha informado de que las VLP son morfológica y antigénicamente similares a viriones auténticos. Además, se ha informado de que la inmunización con VLP provoca la producción de anticuerpos neutralizantes de virus. Más específicamente, los resultados con una diversidad de papilomavirus animales (papilomavirus oral canino y papilomavirus-4 bovino) han sugerido que la inmunización con VLP provoca protección contra posteriores infecciones con papilomavirus. Por consiguiente, las VLP compuestas por proteínas L1 de HPV se han propuesto como vacunas para prevenir enfermedades asociadas con infecciones por papilomavirus humanos.

30 Por ejemplo, se ha informado de que la proteína L1 puede ensamblarse en VLP cuando se expresa usando vectores de baculovirus y virus vaccinia recombinantes y en levaduras recombinantes (Hagensee *et al*, *J. Virol.*, 68:4503-4505 (1994); Hofmann *et al*, *Virology*, 209:506-518 (1995); Kirnbauer *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:12180-12184 (1992); Kirnbauer *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*, 92:11553-11557 (1995); Volpers *et al*, *Virology*, 200: 504-512 (1994); Zhou *et al*, *J. Virol.*, 68:619-625 (1994)).

40 Las preparaciones de L1 recombinante más previas aisladas de células eucariotas han provocado una población variable de VLP que se acercan a 55 nm de diámetro, que son similares en aspecto a viriones intactos. Sin embargo, el ensamblaje de VLP es algo sensible al tipo celular. Por ejemplo, L1 expresada en *Escherichia coli* se expresa principalmente en forma de capsómeros o más pequeño, con pocas o ninguna cápsida aparente en la célula o después de purificación (Rose *et al*, *J. Virol.*, 67: 1936-1944 (1993); Li *et al*, *J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)). Se observan resultados similares cuando se expresa la proteína de poliomavirus VP1 en *E. coli* (Salunke *et al*, *Biophys. J.*, 56:887-900 (1989)).

50 Hasta la fecha, no ha habido un método eficaz para provocar respuestas de anticuerpos neutralizantes de elevado título contra dos o más tipos de HPV con una única VLP. De hecho, debido a la rareza de existencias de papilomavirus humanos auténticos, se ha realizado muy poco trabajo sobre respuestas cruzadas de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, se ha examinado la capacidad de las VLP de HPV de provocar antiseros que reaccionarían de forma cruzada con otros tipos de VLP de HPV. Se han ensayado los anticuerpos contra tipos de VLP de HPV individuales por ELISA para la reactividad con una diversidad de tipos de VLP de HPV diferentes. En general, la reactividad de anticuerpos contra VLP de HPV es específica de tipo. El antisero reacciona con la VLP que se usó en la generación del antisero pero no con otros tipos de VLP de HPV. En casos en los que se ha informado de un elevado grado de reactividad cruzada del antisero con otros tipos de VLP, las secuencias de aminoácidos del tipo de HPV heterólogo han sido altamente homólogas al tipo original. Por ejemplo, se ha informado de fuertes reacciones cruzadas de anticuerpos anti-VLP entre HPV-6, HPV-11 y entre HPV-18, HPV-45 (R.C. Rose, personal communication, W. White *et al.*, in preparation, L. F. Zang (2000) Vaccine 1051-1058). La actividad neutralizante cruzada de antiseros de reacción cruzada se ha evaluado en los pocos casos en que están disponibles existencias de HPV y se han desarrollado ensayos de infectividad. Se ha informado de ensayos de infectividad *in vitro* para HPV-11, 16, 18 (Smith *et al.*, 1995 *J. Invest. Dermatol.* 105: 1-7, White *et al.*, 1998 *J. Virol.* 72: 959-964, White *et al.*, 17th international Papillomavirus Conference, 1999). Además, recientemente se han desarrollado ensayos para HPV-31 y 45 (S. Wilson, resultados no presentados). Los resultados con estos ensayos han indicado que una fuerte reactividad cruzada es indicativa de actividad neutralizante cruzada (White, *et al.*, 1998 *J. of Virol.* 72: 959-964, White *et al.*, 17th International Papillomavirus Conference, 1999, Wilson, *et al.*, resultados no publicados). En cada caso, sin embargo, el título de neutralización cruzada siempre ha sido significativamente inferior (10-100 veces) que la reactividad contra el tipo homólogo. El nivel de anticuerpos que se necesitará para proporcionar protección contra infección por HPV no es conocido. Sin embargo, una creencia ampliamente mantenida es que títulos de anticuerpos mayores proporcionarán mayores niveles de protección. Por tanto, la

restricción actual es que una cobertura de base amplia contra una diversidad de tipos de HPV requerirá la inclusión de múltiples tipos de VLP. Cada tipo de VLP adicional representa cuestiones de producción y purificación así como aumentos en la complejidad y coste de la vacuna. Por lo tanto, sería ventajoso minimizar la cantidad de tipos de VLP y además producir un producto capaz de provocar respuestas protectoras o terapéuticas contra una diversidad de tipos de HPV.

Steven *et al.* (Journal of Virology, Julio 1996, pág. 4791-4794) describe que la unión de anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos de HPV11 puede redirigirse a partículas tipo virus de L1 de HPV6 por dos sustituciones de restos aminoacídicos correspondientes para L1 de HPV11.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un nuevo método para la inducción de respuestas de anticuerpos neutralizantes de elevado título o respuestas celulares terapéuticas contra HPV 18 y HPV 45 y opcionalmente tipos adicionales de HPV con una única molécula L1 quimérica. Creando una VLP de L1 quimérica capaz de provocar respuestas de anticuerpos o respuestas celulares comparables a las inducidas por dos o más tipos de VLP individuales, los métodos de la invención disminuyen la necesidad de una cantidad grande de tipos de VLP en vacunas basadas en VLP de HPV.

Las nuevas VLP de L1 de HPV quiméricas de la presente invención pueden usarse para el diagnóstico de infecciones por HPV previas o actuales y también para evaluar el nivel de respuestas de anticuerpos protectores encontradas en fluidos corporales. El uso de la molécula quimérica de este modo disminuiría la cantidad de ensayos necesarios y la cantidad de componentes necesarios requeridos para definir estos parámetros.

Las VLP de HPV quiméricas de la presente invención también pueden emplearse para la encapsulación de restos deseados, por ejemplo, agentes de diagnóstico o terapéuticos tales como ligandos de dirección, antivirales, y radio-núclidos, y el uso de los mismos como "pseudoviriones" para suministrar agentes terapéuticos a células y evaluar la eficacia de vacunas o agentes terapéuticos putativos.

Breve descripción de la invención

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas L1 de HPV-18 y HPV-45 son altamente homólogas siendo un 86% idénticas en la secuencia de aminoácidos. Las VLP de L1 de HPV-18 y VLP de HPV-45 provocan antisueros que reaccionan de forma cruzada entre sí (White *et al.*, in preparation, Wilson *et al.*, 18th International Papillomavirus Conference). Se han desarrollado ensayos de infectividad *in vitro* tanto con soluciones madre de HPV-18 (White *et al.*, in preparation) como con soluciones madre de HPV-45 (Wilson *et al.*, Abstract, 18th International Papillomavirus Conference), cada una tiene un producto de cultivo organotípico (Meyers *et al.* Abstract, 18th International Papillomavirus Conference). Los ensayos de infectividad se utilizaron para demostrar que el suero anti-VLP de HPV-18 neutraliza tanto virus HPV-18 como virus HPV-45. Además, el suero anti-VLP de HPV-45 neutraliza HPV-18 además de HPV-45. Por tanto, están presentes epítomos de neutralización cruzada tanto en HPV-18 como en HPV-45. Sin embargo, en ambos casos, la potencia del antisuero de neutralizar el virus homotípico fue 100 veces mayor que contra el virus heterotípico.

Como un medio para generar una VLP que provocaría potentes títulos neutralizantes contra ambos tipos de virus, se generaron cuatro moléculas L1 de HPV-18/45 quiméricas diferentes intercambiando segmentos del gen de L1 con segmentos homólogos del gen de L1 de HPV-45. Las cuatro moléculas L1 quiméricas formaron VLP como se demuestra por microscopía electrónica. Cada VLP de L1 quimérica se ensayó por ELISA para la reactividad con tres anticuerpos monoclonales neutralizantes de HPV-18 (R5, J4, 195), que reconocen distintos sitios sobre VLP de L1 de HPV-18. Una de las VLP quiméricas no logró unir anticuerpos monoclonales (mAb) J4 y 195 pero unió R5. Sorprendentemente, los anticuerpos generados en ratones contra esta VLP quimérica presentó títulos neutralizantes contra HPV-18 y HPV-45 que fueron de magnitud comparable a los provocados por las VLP homotípicas. Aunque los epítomos J4 y 195 se perdieron, el mantenimiento del epítomo R5 (y quizá otros 18 epítomos) así como la inclusión de epítomos neutralizantes de HPV-45 en un formato VLP, proporcionó la estructura necesaria para la inducción de respuestas neutralizantes de elevado título contra ambos tipos de virus. Por tanto, en resumen, se ha descubierto que una VLP de L1 de HPV quimérica que consta de los aminoácidos 1-265 de HPV 18, seguido de los aminoácidos 265-442 de HPV 45, y que acaba con los aminoácidos 443-507 de HPV 18 provoca respuestas neutralizantes de elevado título contra ambos tipos de virus. Estas respuestas son de mayor magnitud que las inducidas por cualquier tipo de VLP contra el virus heterólogo. Además, las respuestas de anticuerpos contra los epítomos J4 y 195 no son necesarias para la inducción de respuestas neutralizantes potentes contra HPV-18. En base a estas observaciones, debe ser posible proporcionar proteínas L1 quiméricas funcionales con otras combinaciones de HPV, especialmente cuando hay un elevado nivel de homología, es decir, mayor de aproximadamente el 75%, y un elevado nivel de reactividad cruzada.

Definiciones

Proteína principal de la cápsida o proteína L1: la proteína estructural de papilomavirus (PV) que constituye la parte principal de la estructura de cápsida PV. Esta proteína ha presentado aplicación en la preparación de vacunas contra HPV y como agente de diagnóstico.

ES 2 301 551 T3

Partículas tipo virus o VLP: la estructuras tipo cápsida que se producen después de la expresión y ensamblaje de una secuencia de ADN de L1 de papilomavirus sola o en combinación con una secuencia de ADN de L2. Las VLP son morfológica y antigénicamente similares a viriones auténticos. Las VLP pueden producirse *in vivo*, en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, células hospedadoras de mamífero y de insecto, o pueden formarse espontáneamente después de la purificación de proteínas L1 recombinantes. Además, pueden producirse usando fragmentos de L1 o formas mutadas de la misma, por ejemplo proteínas L1 que se han modificado por la adición, sustitución o delección de uno o más aminoácidos. Los mutantes L1 que están dentro del alcance de la presente invención son aquellos que después del re-ensamblaje de la VLP presentan al menos un epítipo conformacional de PV. Por ejemplo, esto incluye proteínas L1 que se han truncado en el último resto de glutamina conservado en el extremo carboxi-terminal. La escisión en dicho resto de glutamina retirará, de promedio, de 30 a 40 restos aminoacídicos de la proteína L1. Los mutantes o fragmentos adecuados pueden determinarse en base a la reactividad de dichas proteínas L1 con antisuero neutralizante o su capacidad de producir antisuero neutralizante.

Proteína L1 correctamente plegada: proteína L1, fragmento de la misma, o forma mutada de la misma, (monomérica, en forma de pequeños oligómeros (dímeros-tetrámeros) o capsómeros), que, después de la expresión, adopta una estructura conformacional que presenta uno o más epítopos de L1 de HPV conformacionales presentes en cápsidas virales nativas o VLP y es adecuada para ensamblarse en VLP. En la presente invención, una proteína L1 de HPV quimérica correctamente plegada presentará uno o más epítopos conformacionales de L1 de HPV de cada uno de los tipos de HPV usados para preparar la proteína quimérica.

Epítipo conformacional de L1 de HPV: un epítipo expresado sobre la superficie de una proteína L1 correctamente plegada que también se expresa por una proteína L1 o fragmento, o forma mutada de la misma, que también se expresa por una proteína L1 de un HPV infeccioso de tipo silvestre correspondiente. Está bien aceptado por los especialistas en la técnica que la presentación de epítopos conformacionales es esencial para la eficacia (como agentes tanto profilácticos como de diagnóstico) de inmunógenos proteicos de L1 de HPV.

Epítipo neutralizante conformacional de L1 de HPV: un epítipo expresado sobre la superficie de la proteína L1 correctamente plegada, fragmento o forma mutada de la misma, que también se expresa por una proteína L1 de un HPV infeccioso de tipo silvestre correspondiente, y que provoca anticuerpos neutralizantes. Está bien aceptado por los especialistas en la técnica que la presentación de epítopos neutralizantes conformacionales es esencial para la eficacia (como agentes tanto profilácticos como de diagnóstico) de inmunógenos proteicos de L1 de HPV.

Anticuerpo conformacional: un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo expresado sobre una proteína L1 correctamente plegada pero no sobre la proteína L1 desnaturalizada.

Molécula L1 quimérica: la secuencia de nucleótidos de un tipo de HPV que contiene diversos segmentos de la secuencia de nucleótidos análoga de un(os) tipo(s) adicional(es) de HPV.

VLP quimérica: una VLP compuesta por una molécula L1 quimérica.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación diagramática de las moléculas L1 18/45 quiméricas. Se introdujeron sitios para la endonucleasa de restricción en la secuencia de L1 de HPV 45 por mutagénesis dirigida al sitio, y los fragmentos de ADN digeridos se usaron para remplazar regiones homólogas de L1 de HPV18. Los números entre paréntesis indican la localización de la secuencia del gen de L1 de HPV 45 que se usó para remplazar el gen de L1 18.

Figura 2A: Panel de suero anti-VLP sobre VLP de HPV-18. Se recubrieron placas ELISA con VLP de HPV-18 y se hicieron reaccionar con antisueros de diluciones en serie de factor 2 generados en conejos contra los tipos de VLP de HPV indicados. Solamente el suero anti-HPV-18 y, en menor grado, el suero anti-HPV-45 mostraron unión significativa a las VLP de HPV-18 sobre el intervalo de dilución examinado.

Figura 2B: Panel de suero anti-VLP sobre VLP de HPV-45. Las VLP de HPV-45 se recubrieron en placas ELISA y se hicieron reaccionar con el mismo panel del antisuero anti-VLP de HPV que en la Fig. 2A. Los resultados muestran que la reactividad contra las VLP de HPV-45 es muy específica de tipo; sin embargo, el suero anti-HPV-18 presentó el mayor grado de reactividad cruzada.

Figura 3: Se preincubó HPV-18 con sueros anti-VLP de HPV-11, 16, 18, 33, 35, 39, o 45 y después se añadieron a células HaCaT. Se generaron productos de RT-PCR específicos de E1E4 de HPV-18 y específicos de β -actina celular con ARN aislado de las células infectadas. El ARN y RT-PCR se realizaron esencialmente como se describe en White *et. al.*, 1998, excepto en que el cebador externo directo específico de HPV 18 era 5'GACTCCAACGACG CAGAGAAAC3' y el cebador externo inverso era 5'GTCCACAATGCTGCTTCTCCG3'. El cebador directo anidado era 5'GTATGCATGGACCTAAGGCAAC3', y el cebador anidado inverso era 5'TCCACAGTGTCCAGGTCTGT3'. Solamente los sueros anti-HPV-18 y anti-HPV-45 neutralizaron el virus.

Figura 4: Titulación de la actividad anti-18 y anti-45 para HPV-18: se preincubó HPV-18 con suero de conejo preinmune diluido 1:100 (carril V), con diluciones en serie log 10 de suero anti-VLP de HPV-18, o con diluciones en serie log 10 de suero anti-VLP de HPV-45, antes de la adición de queratinocitos. Como control, se incubó una

ES 2 301 551 T3

alícuota adicional de células sin virus (carril C). Se obtuvieron productos de RT-PCR con ARN total y cebadores de PCR específicos de HPV-18 como se ha descrito en la figura 3. El suero anti-VLP de HPV-18 inhibió la detección del transcrito E1E4 a las diluciones 1:10⁵, mientras que el suero anti-HPV-45 solamente neutralizó a diluciones de 1:10³.

5 Figura 5: Se preincubó HPV-45 con sueros anti-VLP de HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, o 45 y después se añadieron a células HaCaT. Se generaron productos de RT-PCR específicos de E1E4 de HPV-45 y específicos de β -actina celular con ARN aislado de las células infectadas. Solamente los sueros anti-HPV-18 y anti-HPV45 neutralizaron el virus.

10 Figura 6: Unión de mAb reactivos a HPV-18 y HPV-45 a VLP 18/45 de L1 quiméricas: HPV-18, HPV-45, o las VLP 18/45 de L1 quiméricas se unieron a placas de microtitulación como se describe en Materiales y Métodos. Fluidos ascíticos de las líneas celulares de hibridoma que secretan mAb se diluyeron 1:128.000 y se ensayaron para la reactividad de unión contra las diversas VLP. Los mAb R5, J4 y 195 son neutralizantes de HPV-18. El mAb E30 reconoce preferentemente un epítipo conformacional sobre VLP de HPV-45 pero también reacciona menos fuertemente con VLP de HPV-18. Se detectó la unión específica de los mAb a las diversas VLP por un reactivo anti-Ig de ratón biotinilado a través de una lectura colorimétrica generada por estreptavidina peroxidasa de rábano rusticano y sustrato (TMB). Las lecturas de densidad óptica se registraron a 450 nm después de incubación de 15 minutos con el sustrato y la adición de un reactivo de detención para terminar el desarrollo de color. Se calcularon promedios de pocillos duplicados como los valores de O.D. finales.

20 Figura 7: Reactividad de sueros anti-VLP de L1 18/45 quiméricas policlonales sobre VLP de HPV-18 y HPV-45: Se generaron antisueros contra HPV-18, 45, y las VLP de L1 18/45 XN, NB, y BH en ratones suizos exogámicos. Cinco ratones se inmunizaron de forma subcutánea en las semanas 0 y 3 con 2 μ g de la VLP indicada adsorbida a hidróxido de aluminio (concentración final de 1 mg/ml de Al). Los antisueros se recogieron en la semana 5 (dos semanas después de la inmunización secundaria). Los antisueros combinados de cada grupo se diluyeron 1:4000 y se ensayaron para la reactividad con VLP de HPV-18 o HPV-45 por ELISA. Se detectó la unión específica por un reactivo anti-Ig de ratón biotinilado a través de una lectura colorimétrica generada por estreptavidina peroxidasa de rábano rusticano y sustrato (TMB). Las lecturas de densidad óptica se registraron a 450 nm después de incubación de 15 minutos con el sustrato y la adición de un reactivo de detención para terminar el desarrollo de color. Se calcularon promedios de pocillos duplicados como los valores de O.D. finales.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona proteínas L1 de HPV quiméricas que son capaces de provocar respuestas de anticuerpos o respuestas celulares comparables a las inducidas por HPV 18 y HPV 45 y opcionalmente tipos de HPV individuales. Esto significa que las proteínas quiméricas de la invención son capaces de generar títulos neutralizantes contra dichos dos o más tipos de HPV de una magnitud generalmente comparable al título neutralizante generado si cada uno de dichos dos o más tipos de HPV se habían administrado por separado. Generalmente comparable significa que el título neutralizante de la proteína L1 quimérica y VLP contra cada tipo de virus usado para preparar la proteína quimérica es al menos el 50% del título neutralizante generado contra cada virus homotípico. Esto es una mejora significativa sobre la respuesta generada por una única VLP de HPV nativa (no quimérica), donde la fuerza de la actividad neutralizante cruzada, es decir, la capacidad del suero de neutralizar los tipos de HPV diferentes al tipo nativo, es siempre significativamente inferior que la reactividad cruzada del suero, y la capacidad del suero de neutralizar virus heterotípico (aproximadamente 100 veces inferior con proteínas L1 nativas y VLP no quiméricas).

45 Las proteínas L1 de HPV quiméricas de la invención pueden diseñarse usando secuencias de HPV 18 y HPV 45. Se seleccionan tipos de HPV adicionales entre el grupo compuesto por HPV-11, 16, 31, 33, 35, y 39.

50 Los tipos más preferibles tendrán un elevado nivel de homología, es decir, al menos un 65-75% entre los genes de L1 nativos, como se muestra por HPV-18, 45, y 39. En particular, dichos tipos de HPV son HPV-16, 18, 31, 33 y 45. La proteína L1 de HPV quimérica preferiblemente comprende al menos el epítipo R5 de HPV-18.

55 Un modo de construir proteínas L1 quiméricas es usar un procedimiento "trihíbrido" por el que se unen tres secciones de los genes de L1 de diferentes tipos de HPV, o la sección central de un gen de L1 se reemplaza de la región correspondiente de la otra.

La proteína quimérica "trihíbrido" de la presente invención comprende los aminoácidos 1-265 de HPV-18, seguido de los aminoácidos 265-442 de HPV-45, y finaliza con los aminoácidos 443-507 de HPV-18.

60 Las proteínas L1 de HPV quiméricas de la presente invención pueden usarse para fabricar partículas tipo virus (VLP). Dichas VLP pueden usarse en composiciones de vacuna que comprenden adicionalmente vehículos farmacéuticos y opcionalmente adyuvantes que son conocidos en la técnica. Las VLP quiméricas también pueden usarse en composiciones terapéuticas para el tratamiento de pacientes con infecciones por papilomavirus actuales. Las VLP, vacunas, composiciones terapéuticas y proteínas de la invención pueden emplearse todas para generar antisuero neutralizante de elevado título contra al menos dos tipos de HPV.

65 Actividad neutralizante de elevado título significa que dicha proteína L1 quimérica es capaz de provocar antisuero que neutraliza al menos dos tipos de HPV a una dilución de 1:1000, y más preferiblemente a una dilución de 1:10.000.

ES 2 301 551 T3

La actividad neutralizante demostrada contra cada tipo de virus puede variar dependiendo del nivel conseguido por la administración de virus nativos homotípicos, pero generalmente es al menos aproximadamente el 50% de la actividad neutralizante generada por suero homotípico. El método puede usarse para inducir respuestas de anticuerpos neutralizantes de elevado título o respuestas inmunes mediadas por células contra muchos tipos diferentes de HPV dependiendo de la cantidad de epítomos contenidos en una única molécula L1 quimérica. La cantidad de tipos de HPV contra los que se generan respuestas de anticuerpos puede aumentarse adicionalmente administrando VLP que comprenden más de una molécula L1 quimérica. Por ejemplo, pueden generarse antisueros contra al menos tres tipos de HPV administrando una VLP que comprende al menos dos tipos de proteínas L1 de HPV quiméricas siempre que cada tipo de molécula quimérica tenga al menos un epítomo de L1 que sea de un tipo de HPV diferente del otro.

La invención también incluye genes que codifican las proteínas L1 de HPV descritas en este documento. El gen que comprende secuencias codificantes de HPV-18 preferiblemente comprende al menos los nucleótidos del gen de L1 de HPV-18 nativo que codifica el epítomo R5, y más preferiblemente al menos aproximadamente la mitad N-terminal del gen de L1 de HPV-18 nativo. Un gen preferido de la presente invención comprende el gen de L1 de HPV-18 nativo donde se han remplazado los nucleótidos 624 a 1327 por los nucleótidos correspondientes de HPV-45. "Correspondientes" significa los nucleótidos en la misma posición que los deletados cuando los dos genes nativos se alinean en el modo más homólogo. En los tipos de virus "trihíbrido", los genes recombinantes que codifican las proteínas L1 quiméricas pueden tener segmentos correspondientes que varían de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 1200 nucleótidos.

La invención también comprende vectores que comprenden los genes que codifican las proteínas L1 de HPV quiméricas, unidos de forma funcional a secuencias reguladoras tales como promotores, que dirigen su expresión. Las secuencias de L1 de HPV pueden expresarse en cualquier célula hospedadora que proporcione la expresión de rendimientos recuperables de VLP de HPV. Son bien conocidos sistemas hospedadores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes e incluyen, a modo de ejemplo, bacterias, células de mamífero, levaduras, y células de insecto. Un sistema de expresión preferido comprende el sistema de baculovirus/célula de insecto usado en los ejemplos ya que este sistema proporciona elevados rendimientos de proteína. Sin embargo, las proteínas L1 y L2 de HPV pueden producirse en otros sistemas, en particular bacterias y levaduras.

Son bien conocidos en la técnica vectores adecuados para clonación de expresión de las presentes secuencias de ADN que codifican L1 de HPV y están disponibles en el mercado. Además, también son bien conocidas secuencias reguladoras adecuadas para conseguir la clonación y expresión, por ejemplo, promotores, secuencias de poliadenilación, potenciadores y marcadores de selección. La selección de secuencias apropiadas para obtener rendimientos de proteínas recuperables es rutinaria para un especialista en la técnica.

La presente invención también incluye métodos para vacunar a un sujeto contra al menos dos tipos de HPV que comprenden administrar una composición de vacuna que comprende al menos una proteína L1 de HPV quimérica, donde dicha al menos una proteína L1 de HPV quimérica comprende epítomos neutralizantes para al menos HPV 18 y HPV 45. Se seleccionan preferiblemente tipos adicionales de HPV entre el grupo compuesto por HPV-11, 16, 31, 33, 35, y 39, pero puede ser cualquier tipo de HPV.

La proteína L1 de HPV quimérica de acuerdo con la presente invención comprende los aminoácidos 1-265 de HPV-18, seguidos de los aminoácidos 265-442 de HPV-45, y acabando con los aminoácidos 443-507 de HPV-18. Las composiciones de vacuna pueden incluir tres proteínas L1 quiméricas, o VLP que comprenden proteínas L1 quiméricas.

Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden inducir respuestas inmunes celulares así como títulos de antisueros neutralizantes. Las composiciones pueden incluir adyuvantes o restos adicionales para promover respuestas inmunes celulares además de proteínas quiméricas o VLP, es decir, citoquinas o ligandos del receptor de células T. Dichos restos pueden mezclarse en la composición. Como alternativa, la composición puede construirse de modo que se incorporen dichos restos en la cápsida de VLP. Esto puede hacerse *in vivo* incorporando restos en VLP según se ensamblan dentro de la célula. Como alternativa, esto puede hacerse usando agentes reductores para realizar el desensamblaje y retirada del reactivo para realizar el desensamblaje de la VLP. A este respecto, la descripción del documento con N° de Serie 08/923.997 describe un método para el desensamblaje y re-ensamblaje de VLP de HPV para el propósito de incorporar agentes a suministrar o para dirigir las VLP a células y se incorpora en este documento en su totalidad.

Las vacunas de la invención contendrán una cantidad de las presentes VLP de HPV suficiente para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes en el hospedador contenida en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La administración de las presentes vacunas que contienen VLP puede realizarse por cualquier medio farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, por vía parenteral, de forma local o de forma sistémica, incluyendo a modo de ejemplo, administración oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, y tópica. El modo de administración depende de factores que incluyen la vía natural de infección. La dosificación administrada dependerá de factores que incluyen la edad, salud, peso, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y naturaleza y tipo del papilomavirus humano particular. La vacuna puede emplearse en formas de dosificación tales como cápsulas, soluciones líquidas, suspensiones, o elixires, para administración oral, o formulaciones líquidas estériles tales como soluciones o suspensiones para uso parenteral o intranasal. Se usa preferiblemente un vehículo inerte, inmunológicamente aceptable, tal como solución salina o solución salina tamponada con fosfato.

ES 2 301 551 T3

Las vacunas se administrarán en cantidades terapéuticamente eficaces. Es decir, en cantidades suficientes para producir una respuesta inmunológica protectora. Generalmente, las vacunas se administrarán en dosificaciones que varían de aproximadamente 0,1 mg de proteína a aproximadamente 20 mg de proteína, más generalmente de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg de proteína. Pueden administrarse dosificaciones sencillas o múltiples.

Los métodos de la presente invención hacen posible la preparación de vacunas quiméricas contra HPV para prevenir tipos particulares de infección por papilomavirus. Por ejemplo, como puede asociarse más de un tipo de PV con infecciones por PV, las vacunas pueden comprender VLP de HPV quiméricas estables derivadas de más de un tipo de PV.

Se sabe que una diversidad de neoplasias está asociada con infecciones por PV. Por ejemplo, se han asociado HPV 3a y 10 con verrugas lisas. Se ha informado de que varios tipos de HPV están asociados con epidermodisplasia verruciformis (EV) incluyendo HPV 3a, 5, 8, 9,10, y 12. Se ha informado de que HPV 1, 2, 4, y 7 están asociados con verrugas cutáneas y HPV 6b, 11 a, 13, y 16 están asociados con lesiones de las membranas mucosas (véase, por ejemplo, Kremsdorf *et al*, J. Virol., 52:1013-1018 (1984); Beaudenon *et al*, Nature, 321:246-249 (1986); Heilman *et al*, J. Virol., 36:395-407 (1980); y DeVilliers *et al*, J. Virol., 40:932-935 (1981)). Por tanto, las presentes formulaciones de vacuna pueden comprender VLP quiméricas derivadas de diferentes tipos de HPV dependiendo de la protección deseada.

La presente invención también incluye métodos para tratar una infección por papilomavirus caracterizada por más de un tipo de HPV que comprende administrar una composición terapéutica que comprende VLP de HPV que presentan al menos una proteína L1 quimérica. También se incluyen métodos para tratar una infección por papilomavirus causada por un primer tipo de HPV, de forma concurrente con el tratamiento profiláctico de al menos otro tipo más de infección por HPV que comprende administrar una composición terapéutica que comprende VLP de HPV que presentan al menos una proteína L1 quimérica.

Los métodos terapéuticos de la presente invención proporcionan adicionalmente la introducción de restos deseados, por ejemplo, ADN, proteínas, péptidos, hormonas, radionúclidos, agentes anti-cáncer y agentes antivirales en VLP durante el re-ensamblaje. Esto es ventajoso ya que dichas VLP pueden usarse como vehículos de suministro (para la inserción de restos deseados en células) y como “pseudoviriones” para evaluar la eficacia profiláctica de vacunas contra papilomavirus.

Por ejemplo, los restos que pueden encapsularse en las VLP incluyen restos terapéuticos y de diagnóstico, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico, radionúclidos, hormonas, péptidos, agentes antivirales, agentes antitumorales, agentes moduladores del crecimiento celular, inhibidores del crecimiento celular, citoquinas, antígenos, toxinas, etc. Las presentes VLP, que contienen un resto deseado encapsulado en las mismas, después de la administración a un hospedador deseado, preferiblemente un ser humano, deben captarse por las células normalmente infectadas por el papilomavirus particular, por ejemplo, células epiteliales, queratinocitos, etc., proporcionando de este modo la internalización potencial de dicho resto encapsulado en estas células. Esto puede facilitar el uso de las presentes VLP para terapia (en oposición a los agentes profilácticos) porque posibilita el suministro de un agente terapéutico en un sitio celular deseado, por ejemplo, un sitio de cáncer cervical. Dado el fastidio de los PV en general, esto puede proporcionar un medio altamente selectivo para suministrar restos deseados a células diana. Por ejemplo, puede proporcionar un medio para suministrar secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, un ADN que codifique un polipéptido terapéutico, o una secuencia antisentido.

El resto o restos encapsulados, por supuesto, no deben afectar de forma adversa al ensamblaje y/o estabilidad de las VLP. Esto puede determinarse produciendo VLP que contengan el resto deseado y evaluando sus efectos, si los hay, sobre el ensamblaje y/o estabilidad de las VLP.

En el caso de ADN o ARN, la secuencia nucleica encapsulada puede ser de hasta 8 kilobases, el tamaño del genoma de PV. Sin embargo, típicamente las secuencias encapsuladas serán más pequeñas, por ejemplo, del orden de 1-2 kilobases. Típicamente, estos ADN codificarán un polipéptido deseado, por ejemplo, polipéptido terapéutico, tal como una enzima, hormona, factor de crecimiento, etc. Esta secuencia estará adicionalmente unida de forma funcional a secuencias que faciliten la expresión de la misma en las células hospedadores marcadas como diana.

Otra aplicación de las VLP quiméricas que contienen ADN encapsulados es como “pseudoviriones”. A este respecto, numerosos papilomavirus, incluyendo los implicados en enfermedades humanas, son raros, no pueden propagarse fácilmente *in vitro* y no pueden purificarse fácilmente de fuentes de células humanas en cantidades que faciliten el uso de los mismos en ensayos de neutralización con anticuerpos. Esto es problemático, ya que evita o hace difícil evaluar la viabilidad de vacunas o agentes terapéuticos para la protección contra estos virus HPV específicos. La presente invención debe obviar o al menos reducir dichos problemas.

Esencialmente, se construirán “pseudoviriones” quiméricos que comprendan VLP que están constituidas por una L1 quimérica o una combinación de proteínas L1 y L2 quiméricas del PV particular, y están adicionalmente encapsuladas en las mismas como parte del genoma de dicho papilomavirus o un ADN que codifica un marcador de selección. Este pseudovirión se usará en un ensayo de “infectividad” *in vitro* para evaluar la eficacia de las vacunas VLP correspondientes. Esencialmente, esto se realizará poniendo en contacto células con dichos pseudoviriones. Estos pseudoviriones deben unirse a dichas células y proporcionar la inserción de dicho ADN. Después de ello, puede eva-

ES 2 301 551 T3

luarse la inserción de dichos ADN por métodos conocidos, por ejemplo, métodos de hibridación por PCR, o basados en la expresión del marcador de selección, por ejemplo, β -galactosidasa.

5 Esto se realizará tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos generados contra las proteínas L1 o L2 específicas del HPV particular usado para fabricar la VLP quimérica. Si se inhibe la inserción, como se determina, por ejemplo, en base a la expresión reducida del marcador de selección, esto es una indicación que la proteína L1 o L2 provocaba la producción de anticuerpos neutralizantes de virus.

10 La invención incluye adicionalmente métodos para fabricar una vacuna de tipo multi-HPV o composición terapéutica que comprende

(a) ligar juntas partes que comprenden al menos los aminoácidos 1 a 265 de HPV 18, los aminoácidos 265-442 de HPV 45 y los aminoácidos 443-507 de HPV 18 de los genes de L1 nativos que codifican los diferentes epítomos,

15 (b) clonar las partes génicas ligadas en un vector de expresión; y

(c) expresar el vector en una línea celular que permita la formación de VLP, donde dichas VLP presentan al menos un epítipo neutralizante de L1 a partir de al menos dos tipos diferentes de HPV. Puede usarse PCR para crear salientes compatibles en los extremos de las partes del de L1 para permitir el ligamiento de partes génicas después de la digestión con endonucleasa de restricción. Como alternativa, pueden usarse sitios de restricción existentes en las secuencias nativas de proteínas L1 de HPV para unir partes de L1 de diferentes tipos de HPV.

20 La presente invención también incluye métodos para diagnosticar infecciones por papilomavirus anteriores o actuales que comprenden

25 (a) aislar suero de un paciente que se sospecha que tienen una infección por papilomavirus anterior o actual;

(b) exponer una proteína L1 de HPV quimérica inmovilizada como se ha definido anteriormente a dicho suero para permitir la interacción de unión entre los epítomos de L1 de HPV y el antisuero mientras al mismo tiempo se exponen por separado las L1 de HPV quiméricas idénticas a un antisuero o anticuerpo irrelevante;

(c) lavar dicha L1 de HPV quimérica inmovilizada de modo que se separen los componentes no unidos;

30 (d) exponer dicha proteína L1 de HPV quimérica lavada a un reactivo marcado que se une con especificidad a inmunoglobulinas de dicho paciente; y

(e) comparar la cantidad de marcador unido en cada muestra de L1 de HPV quimérica.

35 Las proteínas L1 de HPV quiméricas pueden incorporarse en VLP, y las proteínas quiméricas o VLP pueden inmovilizarse sobre perlas, la superficie de una placa de cultivo tisular o células a través de una interacción de unión con anticuerpos específicos de L1 o VLP. El marcador unido a las células puede medirse por citometría de flujo o cualquier otro medio rutinario conocido en la técnica. Como alternativa, pueden unirse componentes séricos y después de ello exponerse a VLP quiméricas, cuya unión después se detecta con anticuerpos contra L1 específicos de las L1 de los tipos de virus usados para fabricar la proteína quimérica. El método permite que se exploren anticuerpos para al menos dos tipos diferentes de HPV simultáneamente usando dos reactivos marcadores diferentes.

40 Cuando se usan para el diagnóstico o determinación del serotipo, las VLP quiméricas de acuerdo con la invención pueden marcarse usando cualquiera de una diversidad de marcadores y métodos de marcaje. Los ejemplos de tipos de marcadores que pueden usarse en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, marcadores enzimáticos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos no radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de toxinas, y marcadores quimioluminiscentes.

45 Los ejemplos de marcadores enzimáticos adecuados incluyen malato hidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, 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.

50 Los ejemplos de marcadores radioisotópicos adecuados 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 , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , y ^{109}Pd .

60 Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados 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 aloficocianina, un marcador de o-ftaldehído, un marcador fluorescamina, etc.

65 Los ejemplos de marcadores de toxinas adecuados incluyen toxina diftérica, ricino, y toxina colérica. Los ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador de luminal, un marcador de isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, y un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa, un marcador de acuorina, etc.

Los especialistas en la técnica conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. La unión de estos marcadores a VLP puede realizarse usando técnicas convencionales habitualmente conocidas para los especialistas en la técnica. Se describen técnicas típicas 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 mencionados en el último son el método de glutaraldehído, el método de peryodato, el método de dimaleimida, el método de éster de maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida, estando todos estos métodos incorporados por referencia en este documento.

La detección de los anticuerpos anti-HPV usando las presentes VLP quiméricas puede mejorarse a través del uso de vehículos. Los vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble hasta algún grado o insoluble para los propósitos de la presente invención. Los especialistas en la técnica apreciarán mucho otros vehículos adecuados para la unión de proteínas, o serán capaces de averiguar los mismos por el uso de experimentación rutinaria.

Habiendo descrito la invención en líneas generales, los siguientes materiales y métodos y ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes a menos que se indique otra cosa.

Materiales y métodos

ELISA para la detección de anticuerpos de ratón anti-VLP de HPV

Se expresaron de forma heteróloga VLP de L1 de HPV-18 y L1 de HPV-45 en células *Trichoplusia ni* (HighFive®) infectadas con baculovirus recombinante que codifica la secuencia de L1 completa cadena abajo del promotor de la polihedrina como se ha descrito (Ghim *et al.*, En M.A. Stanley (ed.) Immunology of human papilomaviruses, Plenum, New York, pág. 147-153 (1993)). Las células se recogieron aproximadamente 72 horas después de la infección, se sedimentaron por centrifugación y se congelaron. Como alternativa, se aislaron VLP de pasta celular reciente que no se había congelado. Para aislar las VLP, la pasta celular se resuspendió en tampón de homogeneización (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía leupeptina, 1 µg/ml de aprotinina y Pefabloc® 50 µM y se lisaron en un microfluidizador (Microfluidics modelo HC8000/3A)). El lisado homogeneizado después se centrifugó a 100.000 x g durante 90 minutos y el sedimento que contenía las VLP de HPV-18 o HPV-45 se resuspendió en PBS que contenía CsCl (405 g/l). El lisado aclarado después se centrifugó durante una noche a 83.000 x g y se recogió la banda de VLP. Las VLP se diluyeron en PBS-NaCl 0,5M y se estratificaron sobre un gradiente de etapas de dos componentes compuesto por sacarosa al 30% y al 65%. Los gradientes se centrifugaron a 167.000 x g durante 3 horas y después se recogió la banda de VLP purificada en la superficie de contacto entre las dos soluciones de sacarosa. Las VLP después se dializaron en PBS-NaCl 0,5M. Se determinó la concentración de proteínas por el ensayo de Bradford (Bradford *et al.*, Anal. Biochem. 72: 248-54 (1976)) usando BSA como proteína de referencia y el contenido de L1 se determinó como se ha descrito (Suzich *et al.*, PNAS, 92: 115553-11557 (1995)). Las VLP purificadas se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta que se usaron.

Las VLP (HPV-18 o HPV-45) se diluyeron en PBS a 800 ng/ml y se distribuyeron alícuotas de 100 µl en placas de microtitulación de 96 pocillos (NUNC Maxisorp, Nalge Nunc International, Dinamarca). Las placas se incubaron a 2-8°C durante una noche y después se calentaron con PBS con Tween 20 al 0,1%. Todas las etapas posteriores se realizaron a 20°C. Las placas se bloquearon durante 1 hora con leche en polvo desnatada al 5% en PBS. Después de lavar, se añadieron diluciones en serie de factor dos de sueros anti-VLP o fluido ascítico que contenía anticuerpos monoclonales anti-HPV-18 o HPV-45 (mAb) en leche en polvo desnatada al 1% a los pocillos por duplicado. Se usaron muestras séricas normales o fluido ascítico que contenía mAb irrelevantes como controles negativos. Después de una incubación de dos horas, las placas se lavaron y se añadió una dilución 1:3.000 de anticuerpos de oveja anti-Ig de ratón biotilado (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) en BSA al 1% a las placas. Las placas se incubaron durante una hora, se lavaron y se distribuyó una dilución 1:2.000 de estreptavidina-peroxidasa de rábano rusticano biotilada en BSA al 1% en cada pocillo. Después de una hora de incubación, las placas se lavaron y se desarrollaron con TMB [3,3',5,5'-tetrametilbenzidina] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) diluida 1:2 en citrato sódico 0,1 M, ácido acético 0,1 M pH 5,8. Después de 15 minutos de incubación, se detuvo la reacción enzimática con H₂SO₄ 0,2 M. Se tomaron lecturas de densidad óptica (O.D.) a 450 nm. Se calcularon promedios de pocillos duplicados como los valores de O.D. finales.

ELISA para la detección de anticuerpos de conejo anti-VLP de HPV

Se generó un panel de antisueros contra VLP de HPV-11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, y 45 en conejos como se ha descrito previamente (White *et al.*, J. Virol. 72: 959-964, 1998). Se recubrieron VLP de HPV-18 o HPV-45 sobre placas de microtitulación como se ha descrito anteriormente. Las placas se lavaron, se bloquearon y se diluyeron los antisueros primarios del mismo modo que el ELISA para los anticuerpos de ratón. Los anticuerpos de conejos específicos de VLP se detectaron con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo (específico de cadena pesada y ligera, Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) diluidos 1:8.000 en leche al 1% en PBS. Después de 1 hora de incubación, las placas se lavaron y se detectó la unión específica con ABTS (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). Las lecturas de densidad óptica se realizaron a 405 nm al punto final de 30 minutos. Se calcularon los promedios de pocillos duplicados como las lecturas de O.D. finales.

ES 2 301 551 T3

Unión de anticuerpo monoclonal a VLP de L1 de HPV-18: resonancia de plasmón superficial (BIAcore)

Todas las etapas se realizaron a 25°C. Se activaron chips sensores CM5 (BIAcore, Inc. Pistataway, NJ) con N-hidroxisuccinimida/1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida según indica el fabricante. Se inyectó una solución
5 400 nM de VLP de HPV-16 de 114 K purificadas en acetato sódico 10 mM, pH 5 sobre un chip activado (Karlsson, R y A. *Fait, J. Immunol. Methods* 200:121-133, 1997). Después se bloquearon los grupos éster sin reaccionar con etanolamina 1 M. Se realizaron estudios de unión con fluido ascítico de las líneas celulares de hibridoma R5, J4, y 195 diluidas con solución salina tamponada con HEPES, pH 7.4. Se inyectaron aproximadamente 100 µl de fluido ascítico diluido sobre el chip sensor acoplado a VLP a un caudal de 10 µl/min. La unión se indicó como un cambio en
10 las unidades de resonancia sobre el chip. Se usó un mAb anti-HPV-16 como control para la unión no específica. Para estudios de unión competitiva por pares, se pasó una cantidad de saturación de un mAb sobre el chip sensor acoplado a VLP seguido de una inyección del mismo mAb o uno diferente. Después de cada ciclo de unión, se regeneró la superficie acoplada a VLP con MgCl₂ 3 M.

15

Microscopía electrónica

Se dejó que se sedimentaran muestras proteicas sobre rejillas recubiertas con formvar-y-carbono (Electron Microscopy Sciences), se envasaron en seco y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2% recién filtrado, pH 6,8. Se examinaron
20 las rejillas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo 1005 a un voltaje de aceleración de 100 kV y se fotografiaron a aumentos nominales de 15-25.000x.

Construcción del Vector de Transferencia de Baculovirus que contiene L1 de HPV 18 y L1 de HPV45

25

Se amplificó el gen de L1 de HPV 18 por PCR, colocando un sitio *Bgl*III delante del sitio de inicio y un sitio *Hind*III distal al codón de parada. El producto de PCR se clonó en el pCR2.1. (In Vitrogen) y la secuencia se confirmó por secuenciación automatizada de ADN. Se usó una estrategia similar para clonar el gen de L1 de HPV45 en pCR2.1. Para producir un vector de transferencia de baculovirus, se escindió el gen de L1 18 de 1,5 kb del plásmido pCR
30 18L1 usando las endonucleasas de restricción *Bgl*III y *Hind*III, se purificó por electroforesis en gel de agarosa, y se ligó en pFastBac (LifeTechnologies) que se había digerido con *Bam*HI y *Hind*III. Este clon se denominó pFB 18 L1. Se usó una estrategia idéntica para subclonar el gen de L1 de HPV 45 en pFastBac. Este clon se denominó pFB 45 L1.

35

Construcción de Genes de L1 Quimera de HPV 18/45

Se construyó un total de cuatro baculovirus recombinantes que contenían series de L1 quiméricas de HPV 18/45. Se construyeron tres baculovirus recombinantes que contenían genes quimera de L1 de HPV 18/45 usando mutagénesis dirigida al sitio para colocar sitios de restricción en el gen de L1 de HPV 45 para coincidir con los sitios
40 específicos encontrados en el gen de L1 de HPV 18. La cuarta VLP quimérica aprovechó la ventaja de un sitio de restricción que existía en ambas secuencias. La Tabla 1 muestra las secuencias de los oligonucleótidos usados para colocar sitios de endonucleasa de restricción en la secuencia codificante de L1 de HPV-45. Se usaron fragmentos de restricción para remplazar regiones homólogas en la secuencia codificante de L1 de HPV-18 para producir genes de L1
45 quiméricos.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

Tabla 1: Cebadores de PCR Usados Para la Construcción de Genes de L1 Quiméricos de HPV 18/45

Gen de L1	Cebador de PCR Directo	Cebador de PCR Inverso
L1 de HPV18	<p>5'<u>CAGATCAGATCTA</u>TG BglII Met GCCTTGTGGCGGCCTA GTG3'</p>	<p>5'TATGCAAGCTTACTT HindIII Stop CCTGGCACGTACACGC AC3'</p>
L1 de HPV45	<p>5'<u>CCATAGAGATCTA</u>TG BglII Met GCCTTGTGGCGGCCTA GT3'</p>	<p>5'AAGCGAAGCTTATT HindIII Stop CTTACTACGTATACGT AC3'</p>
L1 18/45 BX	<p>5'<u>CCATAGAGATCTA</u>TG BglII Met GCCTTGTGGCGGCCTA GT3'</p>	<p>5'<u>CCATAGAGATCTA</u>TG BglII Met GCCTTGTGGCGGCCTA GT3'</p>
L1 18/45 XN	<p>5'AGGCAGTCTAGATT XbaI ATTAACGTAGGCAA3'</p>	<p>5'ACTAAAAATCCATGGC NcoI CCCATAACCTGTATCC AC3'</p>
L1 18/45 NB	<p>5'<u>TGGCCATGGATTTT</u> NcoI AGTACATTGCAGG3'</p>	<p>5'AAGCGAAGCTTATT HindIII Stop CTTACTACGTATACGT AC3'</p>

ES 2 301 551 T3

Para producir el gen denominado 18/45 BX, se sintetizaron oligonucleótidos homólogos a L1 de HPV 45 para colocar un sitio *Bgl*III proximal al codón de inicio en el cebador directo y un sitio *Xba*I cambiando la C en la posición 120 a una T y la C en el nucleótido 121 a una A en el cebador inverso. Estos cebadores se usaron para amplificar un fragmento de 125 pares de bases usando el gen de L1 de HPV 45 como molde. El amplicón resultante se digirió con *Bgl*III y *Xba*I y se usó para reemplazar el fragmento homólogo del gen de L1 de HPV 18. El clon pCR 18 L1 se digirió con *Xba*I y *Hind*II y el fragmento de 1,4 Kb se aisló por electroforesis en gel de agarosa. Después se realizó un ligamiento de tres modos usando el vector de transferencia de baculovirus pFastBac (Life Technologies) que se había digerido con *Bam*HI y *Hind*II, el amplicón de HPV 45 digerido con *Bgl*III y *Xba*I y el fragmento de L1 de HPV 18 que se había digerido con *Xba*I y *Hind*III. El gen quimera resultante, que consta de los primeros 122 nucleótidos de HPV 45 seguido de 1403 nucleótidos del gen de L1 de HPV 18, que codifica tres cambios de aminoácidos a partir de la secuencia parental de L1 de HPV 18.

Para producir el gen denominado 18/45 XN, se diseñó un cebador de PCR directo para colocar un sitio *Xba*I en el gen de L1 de HPV 45 cambiando la C en la posición 120 a una T y la C en la posición 121 a una A. El cebador inverso se diseñó para colocar un sitio *Nco*I en el gen de L1 de HPV 45 cambiando la A en el nucleótido de la posición 624 a una C. Se amplificó un fragmento de 502 pares de bases usando estos cebadores y L1 de HPV45 como molde por PCR. El amplicón resultante se digirió con *Nco*I y *Xba*I. El plásmido pFB 18 L1 se digirió con *Xba*I y *Hind*II y el fragmento de 5,8 Kb se purificó por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de 5,8 Kb se ligó con el producto de PCR de 502 pb que se había digerido con *Xba*I y *Nco*I. El clon resultante constaba del gen de L1 de HPV 18 con los nucleótidos 120 a 623 reemplazados por L1 de HPV 45.

Para producir el gen denominado 18/45 NB, se diseñó un cebador de PCR directo para colocar un sitio *Nco*I en el gen de L1 de HPV 45 sustituyendo una C en la posición 624. El cebador inverso no requería cambios de bases, porque el gen de L1 de HPV 45 de tipo silvestre contenía un sitio *Bam*HI. Por lo tanto, el cebador inverso usado para crear el gen de L1 de HPV 45 de longitud completa se usó con el cebador directo *Nco*I para amplificar un fragmento de 900 pares de bases por PCR. El producto de PCR se digirió con *Nco*I y *Bam*HI y el fragmento de 702 pares de bases se purificó por electroforesis en gel de agarosa y se ligó con el fragmento de 5,6 Kb del plásmido pFB 18 L1 que se había digerido con *Nco*I y *Bam*HI. El clon resultante contenía el gen de L1 de HPV 18 con los nucleótidos 624 a 1327 reemplazados por el gen de L1 de HPV 45.

Para producir el gen denominado 18/45 BH, se digirió el plásmido pFB18L1 con *Bam*HI y *Hind*III y el fragmento de 6 Kb se purificó en gel por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido pFB45L1 también se digirió con *Bam*HI y *Hind*III y el fragmento de 0,2 Kb se purificó por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de 6 kb y de 0,2 Kb se ligaron para producir el plásmido que contenía el gen de L1 de HPV 18 con los nucleótidos 1328 a 1524 reemplazados por el gen de L1 de HPV 45.

Se produjeron baculovirus recombinantes que codificaban diversos genes de L1 usando el Bac to Bac System (Life Technologies, Rockville, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

40 *Ensayo de neutralización de HPV-18 y HPV-45*

Se generaron antisueros contra VLP de HPV 18, VLP de HPV 45 y VLP quiméricas de HPV 18/45 en ratones Webster suizos. A los ratones (5 por grupo) se les inyectó de forma subcutánea 2 g de VLP adsorbidas a adyuvante de hidróxido de aluminio (Alhidrogel®, E.M. Sergeant Pulp and Chemical Co., Inc., Clifton, NJ) en las semanas 0 y 3 y se recogieron muestras séricas en la semana 5. Para determinar si los antisueros provocados en los ratones eran capaces de neutralizar virus HPV 18 y HPV 45, se ensayó la capacidad de los antisueros de bloquear la expresión de un ARNm con corte y empalme de HPV 18 o HPV 45 específico en una línea celular humana (HaCaT).

HaCaT, una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizada (Boukamp *et al*, J. Cell Biol, 106:761-771 (1988)) la proporcionó el Dr. Norbert Fusenig. Las células se cultivaron hasta confluencia en DMEM (LifeTechnologies) suplementado con Suero Bovino Fetal al 10%, glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, penicilina (100 unidades/ml), y estreptomycin (100 µg/ml) en placas de 24 pocillos. Se sonicó una solución madre de virus HPV 18 o HPV 45 (proporcionada por Craig Meyers, Abstract, 18th International Papillomavirus Conference) durante 30 segundos en hielo. Las soluciones madre después se diluyeron 1:800 para HPV 18 o 1:500 para HPV 45 en medio y se mezclaron con antisueros que se habían diluido en serie 10 veces en medio a un volumen final de 0,5 ml. La mezcla virus/antisueros se incubó durante una hora a 37°C. El medio se aspiró de las células HaCaT y se añadió la mezcla virus/antisuero al pocillo. Como control, un pocillo de células en cada placa recibió 0,5 ml de medio sin virus. Las células se cocultivaron con las mezclas de virus/antisueros durante 48 horas a 37°C, momento en el cual se purificó el ARNm de las células usando el kit de captura de ARNm (Roche Molecular Biochemicals, Indpls., IN). El medio se aspiró de las células y las células se lavaron dos veces con 0,5 ml de PBS 1X enfriado en hielo. El lavado final se aspiró de las células y se añadieron 0,25 ml de tampón de lisis a cada pocillo y el lisado celular se transfirió a un tubo de microcentrífuga libre de RNasa. Los lisados celulares se sonicaron durante dos minutos en un sonicador con boquilla en forma de copa sobre hielo para reducir la viscosidad del lisado. El oligo dT biotinilado se diluyó 1:4 con H₂O libre de nucleasa y se añadió 1 µl a cada lisado. Las muestras se incubaron 10 minutos a 42°C para permitir que el oligo dT hibridara con el ARNm. Se transfirió una alícuota de 50 µl del lisado a un tubo de PCR recubierto con estreptavidina y se incubó durante tres minutos a 37°C. Los lisados se retiraron de los tubos de PCR y se desecharon. El ARN capturado en los tubos se lavó tres veces con 200 µl de tampón reciente. Se retiró el exceso de tampón de lavado de los tubos con unas puntas de micropipeta. La capacidad de los antisueros de bloquear la expresión de ARNm con corte y empalme

ES 2 301 551 T3

específico de HPV 18 y H PV 45 se determinó por PCR con transcriptasa inversa ((RT)-PCR). Las reacciones de la RT se realizaron usando reactivos del kit First Strand cDNA (Roche Molecular Biochemicals). Se preparó una mezcla maestra de modo que cada reacción contuviera 5 μ l de tampón 10 X, 5 μ l de dNTP, 10 μ l de MgCl₂, 1 μ l de gelatina, 2 μ l de inhibidor de RNasa, 2 μ l de AMV-RT, en un volumen final de 50 μ l. Se transfirieron alícuotas de cincuenta microlitros de la mezcla maestra a los tubos de PCR que contenían el ARNm capturado. Las muestras se colocaron en un termociclador y se incubaron durante dos horas a 42°C. La mezcla de reacción de ADNc después se retiró de los tubos de PCR y se desechó. El ADNc capturado en los tubos de PCR se lavó con 200 μ l de tampón de lavado. Se necesitó una PCR anidada para detectar el ADNc de E1E4 de HPV. La primera ronda de amplificación se realizó añadiendo una mezcla de PCR al ADNc capturado, utilizando 5'GTTGTGTATGTGTTGTAAGTGTGA3' (localizado en los nucleótidos 786-810 en el genoma de HPV 18) como cebador directo y 5'GTCCACAATGCTGCTTCTCCG3' (localizado en la posición de los nucleótidos 3580-3600 en el genoma de HPV 18) como cebador inverso durante 40 ciclos de PCR. Se usó el diez por ciento de la mezcla de la primera ronda de PCR para las reacciones anidadas con 5'GAATTGAGCTAGTAGAAAGCT3' (localizado en la posición de los nucleótidos 816-840 en el genoma de HPV 18) como cebador directo anidado y 5'TCCACAGTGTCCAGGTCGTGT3' (localizado en la posición de los nucleótidos 3666-3575 en el genoma de HPV 18) como cebador inverso anidado durante 40 ciclos de PCR. Se realizó una serie similar de PCR anidadas para la detección del mensajero con corte y empalme E1E4 de HPV 45. Se realizaron cuarenta ciclos de PCR sobre el ADNc sintetizado a partir de células HaCaT infectadas por HPV 45, usando 5'GAGCTTACAGTAGAGAGCTCG3' (localizado en la posición de los nucleótidos 806-826 en el genoma de HPV 45) como cebador directo y 5'TGTTACCACTACACACTTTCCTTC3' (localizado en la posición de los nucleótidos 3613-3636 en el genoma de HPV 45) como cebador inverso. La amplificación anidada se realizó usando el 10 por ciento de la mezcla de la primera PCR como molde utilizando 5'GCAGAGGACCTTAGAACACTA3' (localizado en la posición de los nucleótidos 827-847 en el genoma de HPV 45) como cebador anidado directo y 5'GAACACAGGAGCGGGTTGTGC3' (localizado en la posición de los nucleótidos 3572-3592 en el genoma de HPV 45) como cebador inverso anidado durante 40 ciclos. Como control para demostrar que el ensayo era capaz de detectar ARNm extraído de células HaCaT, se incluyó una serie adicional de cebadores específicos para β -actina celular en la mezcla de PCR. El cebador directo incluido en la primera reacción era 5'GAACCCCAAGGCCAACCGCGA3' y el cebador inverso era 5'CCACACAGAGTACTTGCGCTCAGG3'. El cebador directo incluido en la reacción anidada era 5'GATGACCCAGATCATGTTTG3' y el cebador inverso era 5'GGAGCAATGATCTTGATCTTC3'. Todas las reacciones de PCR contenían Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 M, 125 ng de cada cebador directo e inverso, y 2,5 unidades de la Taq polimerasa (PE Biosystems) en un volumen final de 50 μ l. El perfil de temperatura para todas las reacciones fue de 95°C durante 2 min., seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Todos los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X y se visualizaron por fluorescencia con bromuro de etidio.

Ejemplo Uno

VLP quiméricas de HPV-18/45, que carecen de los epítomos J4 y 195, provocan fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes contra ambos tipos virales

Se expresaron VLP de L1 de HPV-18 y HPV-45 en células de insecto usando baculovirus recombinantes. Las VLP se purificaron por gradientes de CsCl y sacarosa y se usaron como antígenos de recubrimiento en un ELISA. Se ensayaron antisueros generados en conejos contra un panel de tipos de VLP de HPV para la reactividad con los VLP de HPV-18 y HPV-45. Como se ha informado previamente (White *et al.*, 17th International Papillomavirus Conference), el suero anti-HPV-45 reacciona fuertemente de forma cruzada con VLP de HPV-18 mientras que los antisueros contra varios tipos de VLP de HPV diferentes (11, 16, 18, 33, 35, 39) presentan poca o ninguna reactividad cruzada (Fig. 2A). Además, como se muestra en la Fig. 2B, el suero anti-HPV-18 reaccionaba más fuertemente con VLP de HPV-45 en comparación con los antisueros contra otros tipos de VLP. Sin embargo, la capacidad del suero anti-VLP de HPV-18 de reaccionar de forma cruzada con las VLP de HPV-45 fue menos pronunciada que la unión del suero anti-VLP de HPV-45 sobre las VLP de HPV-18.

Se ha mostrado previamente que el antisuero contra HPV-45 (White *et al.*, 17th International Papillomavirus Conference) neutraliza HPV-18 *in vitro* mientras que los antisueros contra una diversidad de otros tipos de HPV no inhibían la infección por HPV-18 (Fig. 3). Estos resultados se correlacionan con la reactividad de unión de los antisueros como se observa en la Fig. 2A. Se realizó una titulación de la actividad neutralizante relativa de los dos antisueros. Como se muestra en la Fig. 4, el suero anti-HPV-45 era 100 veces menos potente en su capacidad de neutralizar HPV-18 que el antisuero homotípico. Para ensayar la capacidad de diversos sueros anti-VLP de HPV de neutralizar HPV-45, se desarrolló un ensayo de infectividad *in vitro* de HPV-45 que detecta un transcrito específico de virus (Fig. 5). Los resultados mostraron que solamente anti-HPV-45 y HPV-18 inhibía la infección por HPV-45 *in vitro*. Por tanto, existen epítomos de neutralización cruzada tanto contra HPV-18 como contra HPV-45 en ambas moléculas L1.

Para estudiar actividades específicas de tipo y de neutralización cruzada tanto contra HPV-18 como contra HPV-45, se generaron cuatro moléculas L1 quiméricas de HPV-18/45 diferentes reemplazando segmentos de la molécula de HPV-18 con regiones análogas del gen de L1 de HPV-45. Las moléculas L1 quiméricas se purificaron de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante por centrifugación en gradiente de CsCl y sacarosa. El análisis de las diferentes proteínas L1 quiméricas purificadas por microscopía electrónica reveló que todas las nuevas moléculas L1 formaban VLP (datos no mostrados).

ES 2 301 551 T3

Se ensayó la unión de diferentes mAb neutralizantes anti-HPV-18 y uno anti-HPV-45 a las diferentes VLP químicas de HPV-18/45 (Fig. 7). Usando mAb neutralizantes contra HPV-18, se ha demostrado que hay al menos tres epítomos neutralizantes en VLP de HPV-18 (R5, J4, y 195). Se descubrió que los epítomos R5 y J4 eran distintos entre sí mientras que el epítomo 195 solapa parcialmente con los sitios de unión tanto de R5 como de J4 (Tabla 2). En este experimento, las VLP de HPV-18 se unieron a chips sensores CM5 activados (BIACORE). La unión de mAb a las VLP inmovilizadas se midió como un aumento en la masa (unidades de resonancia (RU)). Se dejó que un mAb inicial se uniera a las VLP hasta que se unió una cantidad saturante. Posteriormente, se introdujo el segundo mAb sobre el chip. La interacción independiente de los dos mAb estaba indicada por un gran aumento en las RU. En contraste, se inhibió un segundo mAb que se unió a un sitio común que el primer mAb de la unión resultante en poco a ningún aumento en RU. Por ejemplo, cuando el primer y segundo mAb eran el mismo anticuerpo, el sitio de unión es idéntico y se redujo significativamente o no se detectó la unión adicional por el segundo anticuerpo. Este tipo de experimento, donde el primer y segundo anticuerpos eran idénticos, se muestra en las columnas A, B, y C, donde la introducción repetitiva de mAb 195, J4, y R5 sobre el chip provocó aumentos del 0%, 5,5%, y 21% respectivamente. En contraste, en presencia de J4, el mAb R5 aumentó las unidades RU de un modo similar a cuando se usó un anticuerpo de control como el primer anticuerpo (columna D). Por tanto, estos datos indican que los mAb R5 y J4 se unen a distintos sitios. El epítomo para el mAb 195 solapa parcialmente con los epítomos reconocidos por los mAb R5 y J4. Esto se indica por la inhibición parcial (54% y 61%, respectivamente para J4 y R5) de la unión de mAb 195 en presencia de la unión de J4 o R5 (columnas E y F).

TABLA 2

Estudios de Unión Competitiva con mAb neutralizantes de HPV-18 realizados con tecnología de Biosensor

	A	B	C	D	E	F
Primer anticuerpo ^a	195	J4	R5	J4	J4	R5
Segundo anticuerpo	195	J4,	R5	R5	195	195
% de unión máxima del segundo anticuerpo ^b	0%	5,5%	21%	91,3%	54%	61,1%
^a El primer anticuerpo se introduce sobre el chip acoplado a VLP hasta que se unió la cantidad de saturación. Después, se deja que el segundo anticuerpo se una al chip.						
^b El porcentaje de unión al segundo anticuerpo se expresa como un porcentaje de su unión total (RU) cuando se usó un anticuerpo de control (V5 anti-VLP de HPV-16) como el primer anticuerpo.						

Como se muestra en la Fig. 7, dos de los tres mAb neutralizantes de HPV-18 no reconocen HPV-45 mientras que el mAb R5 reacciona ligeramente de forma cruzada con la VLP heterotípica. Sorprendentemente, tres de las 4 VLP químicas de HPV 18/45, incluyendo la XN química que intercambia los aminoácidos 53-194, retuvieron la actividad de unión con los tres mAb neutralizantes de HPV-18. En contraste, la NB química que intercambia los aminoácidos 267-442, no logró unirse a J4 y 195 pero mantuvo el sitio de unión de R5.

Aún no se ha identificado un mAb neutralizante de HPV-45. Sin embargo, el mAb E30 reconoce un epítomo conformacional (personal communication, Neil Christensen). El mAb E30 reconoce preferentemente VLP de HPV-45 pero se une a VLP de HPV-18 (Fig. 7). El mAb E30 se unió a las VLP químicas pero reaccionó más fuertemente con las VLP de HPV-45.

Se inmunizaron grupos de ratones suizos (5 ratones/grupo) con tres de las cuatro diferentes VLP químicas así como VLP de HPV-18 y HPV-45 adsorbidas a hidróxido de aluminio. Se exploraron muestras séricas combinadas, recogidas después de la inmunización secundaria, por ELISA para la reactividad con VLP de HPV-18 y HPV-45. Como se muestra en la Fig. 8, las dos XN y NB químicas que rempazan los aminoácidos 53-194 y 267-442 de la L1 de HPV-18 con las regiones análogas de L1 de HPV-45 respectivamente, provocaban antisueros que reaccionaban fuertemente con VLP tanto de HPV-18 como de HPV-45. En contraste, los antisueros contra la BH química en la que el extremo C-terminal (aminoácidos 449-506) de L1 de HPV-18 estaba remplazado con la región análoga de L1 de HPV-45, reaccionaba mal con VLP de HPV-45. Además, hubo una predilección del suero anti-VLP de HPV-18 por las VLP homotípicas, mientras que el antisuero anti-45 reaccionaba más uniformemente con las dos secuencias de L1 parentales.

ES 2 301 551 T3

Las muestras séricas combinadas después de la inmunización secundaria con HPV-18, HPV-45 o las tres VLP quiméricas se ensayaron para la actividad neutralizante tanto en HPV-18 como en ensayos de infectividad *in vitro* de HPV-45 (Tabla 3). Se preincubaron HPV-18 y HPV-45 con suero MOUSE diluido con diluciones en serie log10 del suero anti-VLP de HPV-18, suero anti-VLP de HPV-45, y suero anti-VLP quimérica antes de la adición a queratinocitos. Se generaron productos de RT-PCR específica de E1E4 de HPV-18 y HPV-45 y específica de β -actina celular con ARN aislado de las células infectadas. El título de neutralización se expresa como la dilución sérica más elevada que inhibía la detección del mensajero específico de virus. La capacidad del antisuero contra HPV-45 de neutralizar el virus de tipo heterólogo fue un log inferior que el virus de tipo homólogo. La diferencia es incluso mayor para los antisueros anti-HPV-18, que solamente neutralizaron HPV45 a 1:100 para la cepa GU1 frente al título de neutralización de 1:10.000 sobre el tipo de virus homólogo. La capacidad del suero anti-18/45 de neutralizar tanto HPV-18 como HPV-45 es equivalente.

TABLA 3

Neutralización de HPV 18 y HPV 45 por sueros anti-VLP quimérica

Anti-suero	Título de neutralización de HPV 18	Título de neutralización de HPV 45
18L1GU1	10^{-4}	10^{-2}
18L1GU2	10^{-4}	$<10^{-2}$
45 L1	10^{-3}	10^{-4}
18/45XN	10^{-2}	10^{-3}
18/45 NB	10^{-4}	10^{-4}
18/45 BH	$>10^{-4}$	$<10^{-2}$

Los resultados mostraron que aunque los sueros anti-VLP de HPV-18 neutralizaron infecciones por HPV-18 a elevadas diluciones (1:10.000), el título neutralizante contra HPV-45 estuvo por debajo de los límites detectables. En un experimento y solamente 1:100 en un segundo experimento. En contraste, el suero anti-VLP de HPV-45 neutralizó fuertemente (título 1:10.000) el virus HPV-45 y también tuvo actividad neutralizante significativa (título 1:1000) contra infección por HPV-18 *in vitro*. La VLP de L1 quimérica XN 18/45 provocó títulos de neutralización de HPV-18 relativamente bajos (1:100) en comparación con la VLP de HPV-18 o las VLP de L1 quiméricas NB y BH, cada una de las cuales inducían títulos neutralizantes de HPV-18 de 1:10.000. Estos resultados sugieren que los aminoácidos 53-194 (región XN) son importantes para el establecimiento de epítomos neutralizantes de HPV-18 o desempeñan un papel en el plegamiento apropiado de los epítomos en otras regiones de la molécula L1 de HPV-18. Los tres mAb neutralizantes de HPV-18 (R5, J5, y 195) se unieron a las VLP de L1 quiméricas XN 18/45. Sin embargo, la reactividad de los mAb R5 y J4 contra esta VLP quimérica pareció estar reducida con relación al nivel de unión observado en la BH quimérica o la VLP 18 nativa. Aún no se ha determinado si la disminución de la unión de estos dos mAb a la VLP quimérica XN contribuye a la disminución de la actividad neutralizante de HPV-18 o si se perdieron algunos otros sitios de neutralización actualmente no identificados para HPV-18 en la molécula quimérica. La XN quimérica, sin embargo, también es capaz de provocar títulos neutralizantes (1:1.000) contra HPV-45.

En contraste con las VLP de L1 quiméricas XN 18/45, las VLP quiméricas BH, reaccionaban fuertemente con los tres mAb neutralizantes de HPV-18. El antisuero anti-VLP quimérica BH neutralizó fuertemente ($>1:10.000$) la infección *in vitro* por HPV-18 pero no tuvo actividad detectable contra infección por HPV-45. Por tanto, esta VLP quimérica, en que solamente el extremo C-terminal (aminoácidos 449-506) de L1 de HPV-18 se reemplazó con la secuencia análoga de L1 de HPV-45, provocó antisuero con propiedades similares a la secuencia de L1 de HPV-18 intacta.

Inesperadamente, la VLP de L1 quimérica 18/45 que provocó antisuero de elevado título tanto contra HPV-18 como contra HPV-45 era la VLP quimérica NB. Estas VLP, carecen de los sitios de unión tanto 195 como J4 mientras que retienen el epítomo R5. La exploración del antisuero anti-NB quimérica en ensayos de neutralización tanto de HPV-18 como de HPV-45 mostró que el antisuero único neutralizaba ambos tipos de virus a diluciones séricas tan elevadas como 1:10.000. Estos resultados demuestran de nuevo la importancia de mantener la mitad N terminal (aminoácidos 1-194) de L1 de HPV-18 intacta para una fuerte actividad neutralizante anti-HPV-18 y sugieren que los epítomos de neutralización para HPV-45 están en la mitad C terminal de la molécula L1 o que la molécula L1 quimérica forma nuevos epítomos neutralizantes capaces de neutralizar ambos virus.

Los resultados presentados anteriormente, demuestran desde el primer momento, que puede ser posible crear una única molécula L1 quimérica que induzca respuestas neutralizantes de elevado título contra dos o más tipos de HPV. Dicha construcción quimérica reduciría significativamente el coste para producir una vacuna contra HPV con efectos protectores amplios contra una diversidad de tipos de HPV. Además, las VLP quiméricas pueden simplificar los ensayos de exploración de suero dirigidos a la detección de anticuerpos contra tipos de HPV específicos.

ES 2 301 551 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína L1 de HPV quimérica capaz de provocar respuestas de anticuerpos o respuestas celulares que sean generalmente comparables a las inducidas por dos o más tipos de HPV individuales, que comprende al menos tres segmentos, donde los segmentos 1 y 2 están adyacentes y se obtienen de diferentes tipos de HPV, y los segmentos 2 y 3 están adyacentes y se obtienen de diferentes tipos de HPV, donde el segmento 1 contiene los aminoácidos 1-265 de HPV-18, el segmento 2 contiene los aminoácidos 265-442 de HPV-45, y el segmento 3 contiene los aminoácidos 443-507 de HPV-18.
- 10 2. Una VLP que comprende la proteína L1 de HPV quimérica de la reivindicación 1.
3. Una composición de vacuna que comprende la proteína L1 de HPV quimérica de la reivindicación 1.
- 15 4. Un gen que codifica la proteína L1 de HPV quimérica de la reivindicación 1.
5. El gen de la reivindicación 4, que comprende el gen de L1 de HPV-18 nativo donde los nucleótidos 624 a 1327 se han reemplazado por los nucleótidos correspondientes de HPV-45.
- 20 6. Un vector de *baculovirus* que comprende el gen de la reivindicación 4.
7. La VLP de la reivindicación 2, donde dicha VLP es capaz de provocar antisuero que neutraliza al menos dos tipos de HPV a una dilución de 1:1000.
- 25 8. La VLP de la reivindicación 7, donde dicha VLP es capaz de provocar antisuero que neutraliza al menos dos tipos de HPV a una dilución de 1:10.000.
9. Uso de un único tipo de proteína L1 de HPV quimérica de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de una composición farmacéutica para inducir una respuesta de anticuerpos de elevado título o una respuesta inmune mediada por células contra al menos dos tipos de HPV.
- 30 10. El uso de la reivindicación 9, donde el antisuero generado por dicha composición farmacéutica neutraliza dichos al menos dos tipos de HPV a una dilución de al menos 1:1000.
- 35 11. El uso de la reivindicación 10, donde el antisuero generado por dicha composición farmacéutica neutraliza dichos al menos dos tipos de HPV a una dilución de al menos 1:10.000.
12. Uso de una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende al menos una proteína L1 de HPV quimérica correctamente plegada, donde dicha la menos una proteína L1 de HPV quimérica comprende epítomos neutralizantes para al menos dos tipos de HPV para la fabricación de una composición farmacéutica para vacunar a un sujeto contra al menos dos tipos de HPV.
- 40 13. El uso de la reivindicación 12, donde dicha al menos una proteína L1 quimérica se expresa sobre la superficie de una VLP.
- 45 14. Uso de una composición terapéutica que comprende VLP de HPV que presentan al menos una proteína L1 quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar una infección por papilomavirus **caracterizado** por más de un tipo de HPV.
- 50 15. Uso de una composición terapéutica que comprende VLP de HPV que presentan al menos una proteína L1 quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar una infección por papilomavirus causada por un primer tipo de HPV, de forma concurrente con tratamiento profiláctico de al menos un tipo de infección por HPV diferente.
- 55 16. Un método para preparar una vacuna contra múltiples tipos de HPV o composición terapéutica que comprende
- (a) ligar juntas partes de los genes de L1 nativos que codifican los diferentes epítomos;
- (b) clonar las partes génicas ligadas en un vector de expresión;
- 60 (c) expresar el vector en una línea celular que permita la formación de VLP de acuerdo con la reivindicación 2, donde dichas VLP presentan al menos un epítomo neutralizante de L1 a partir de al menos dos tipos diferentes de HPV como se ha definido en la reivindicación 2.
- 65 17. El método de la reivindicación 16, donde se usa PCR para crear salientes compatibles en los extremos de las partes del gen de L1 para permitir el ligamiento de las partes del gen después de digestión con endonucleasas de restricción.

ES 2 301 551 T3

18. El método de la reivindicación 16 que comprende adicionalmente el desensamblaje y re-ensamblaje de la VLP para permitir la incorporación de un agente terapéutico o agente de diagnóstico.

19. Un método para diagnosticar una infección por papilomavirus anterior o actual que comprende

(a) usar suero aislado de un paciente que se sospecha que tiene una infección por papilomavirus anterior o actual;

(b) exponer una proteína L1 de HPV quimérica inmovilizada de acuerdo con la reivindicación 1 a dicho suero para permitir la interacción de unión entre los epítomos de L1 de HPV y el antisuero mientras al mismo tiempo se exponen por separado las L1 de HPV quiméricas idénticas a un antisuero o anticuerpo irrelevante;

(c) lavar dicha L1 de HPV quimérica inmovilizada de modo que se separen los componentes no unidos;

(d) exponer dicha proteína L1 de HPV quimérica lavada a un reactivo marcado que se une con especificidad a inmunoglobulinas de dicho paciente; y

(e) comparar la cantidad de marcador unido en cada muestra de L1 de HPV quimérica.

20. El método de la reivindicación 19, donde dichas proteínas L1 de HPV quiméricas se inmovilizan sobre VLP.

21. El método de la reivindicación 20, donde dichas VLP quiméricas se inmovilizan sobre perlas, la superficie de una placa de cultivo tisular o células.

22. El método de la reivindicación 19, donde se explora la presencia de anticuerpos específicos para al menos dos tipos diferentes de HPV para usar simultáneamente dos reactivos marcados diferentes.

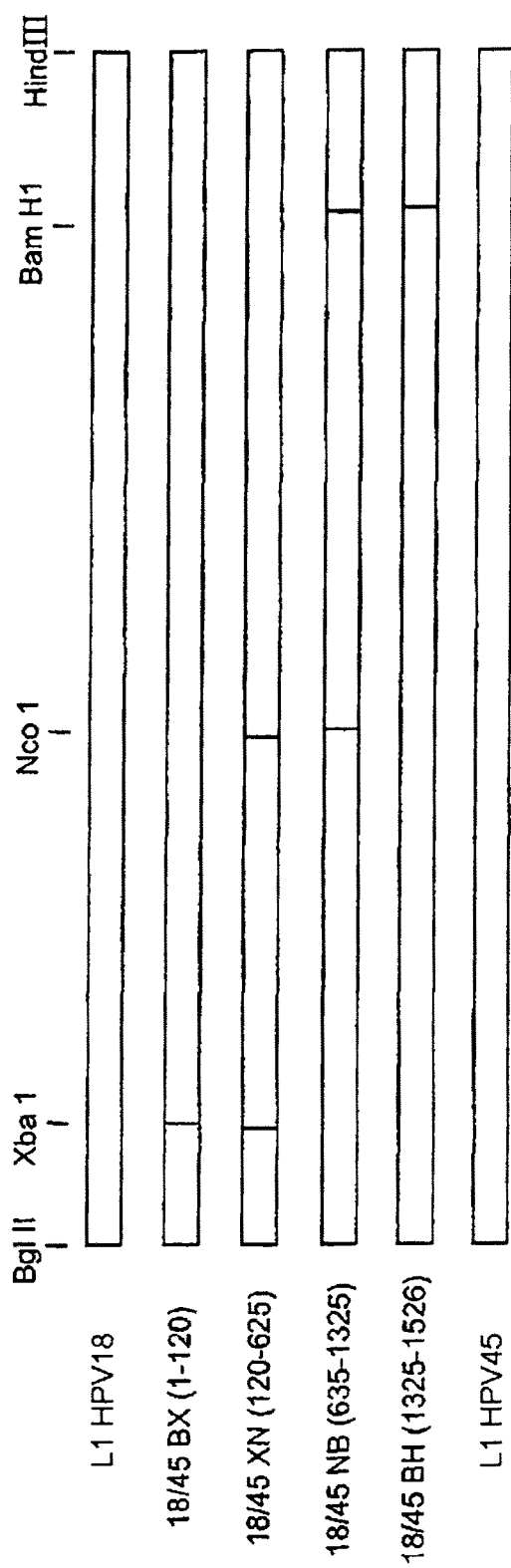


FIG. 1

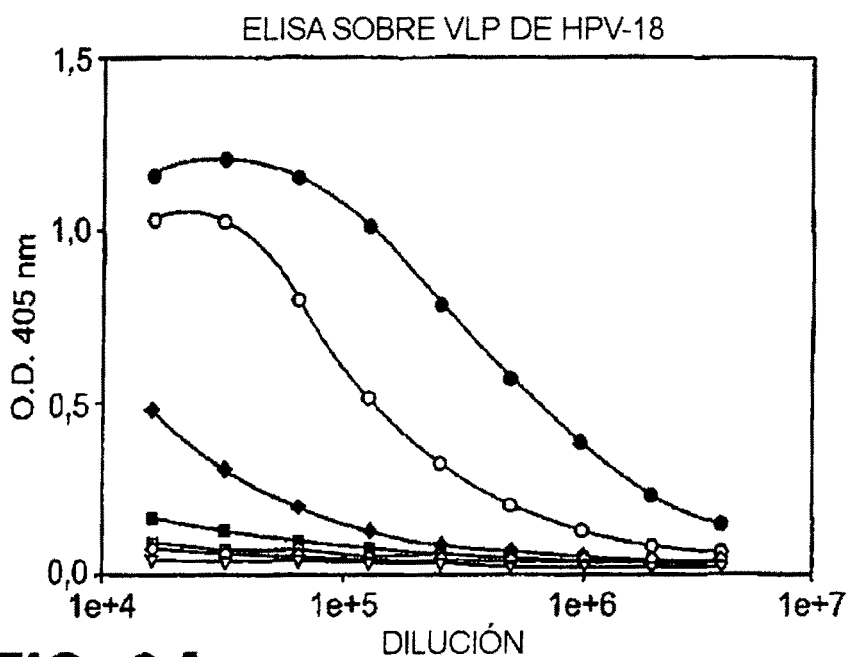


FIG. 2A

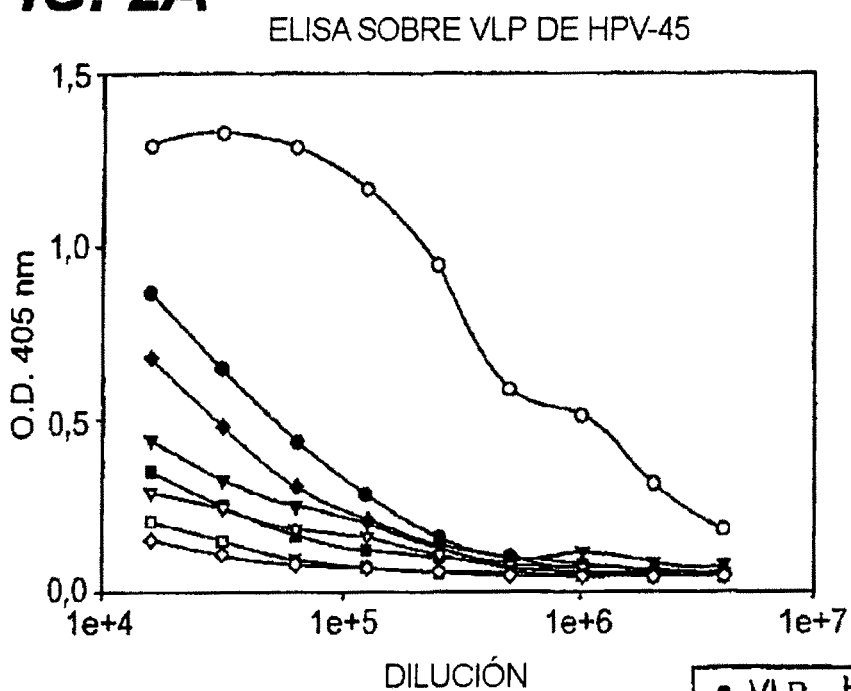


FIG. 2B

●	VLP HPV-18
○	VLP HPV-45
▼	VLP HPV-11
▽	VLP HPV-16
■	VLP HPV-31
□	VLP HPV-33
◆	VLP HPV-35
◇	VLP HPV-39

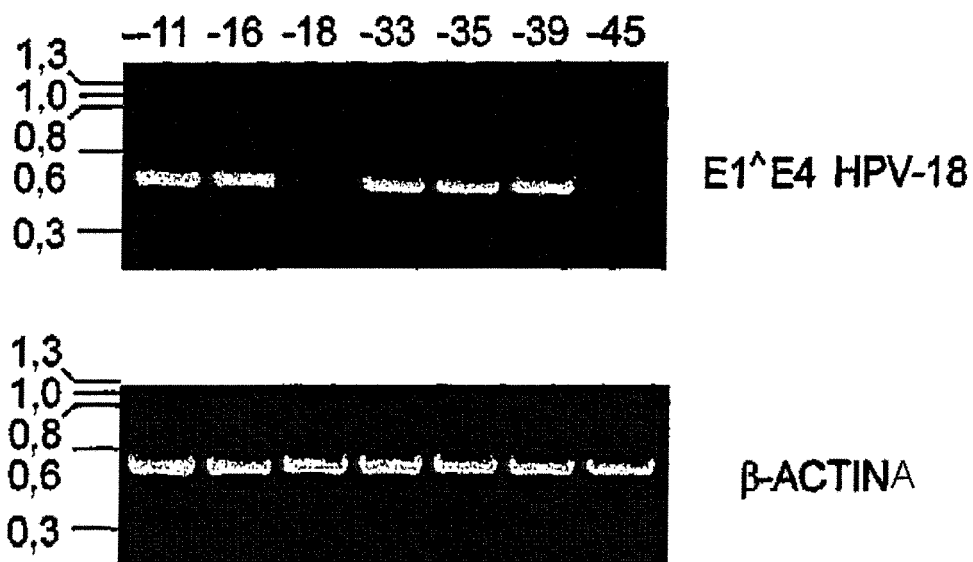


FIG. 3

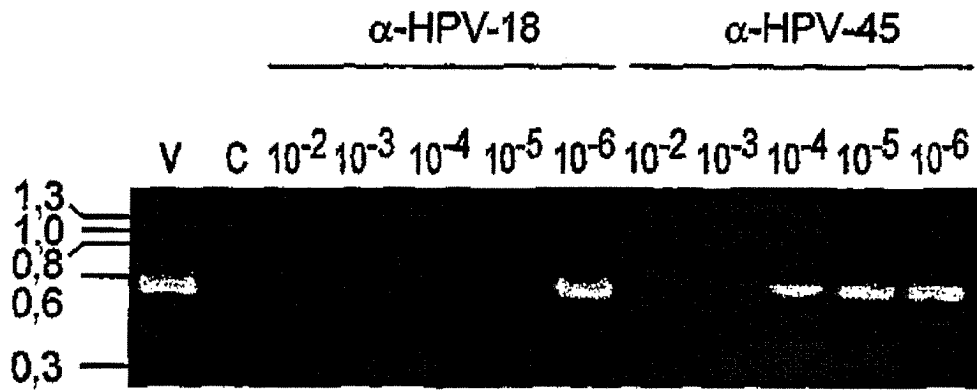


FIG. 4

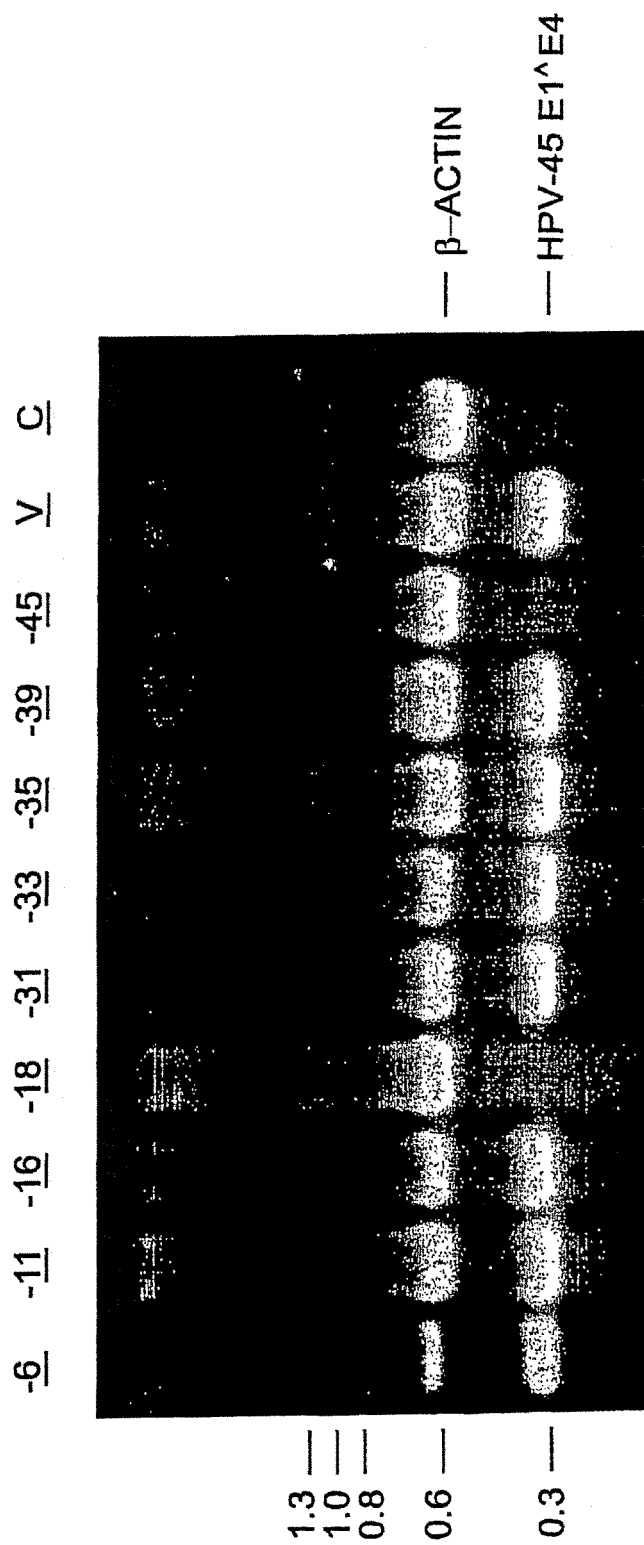
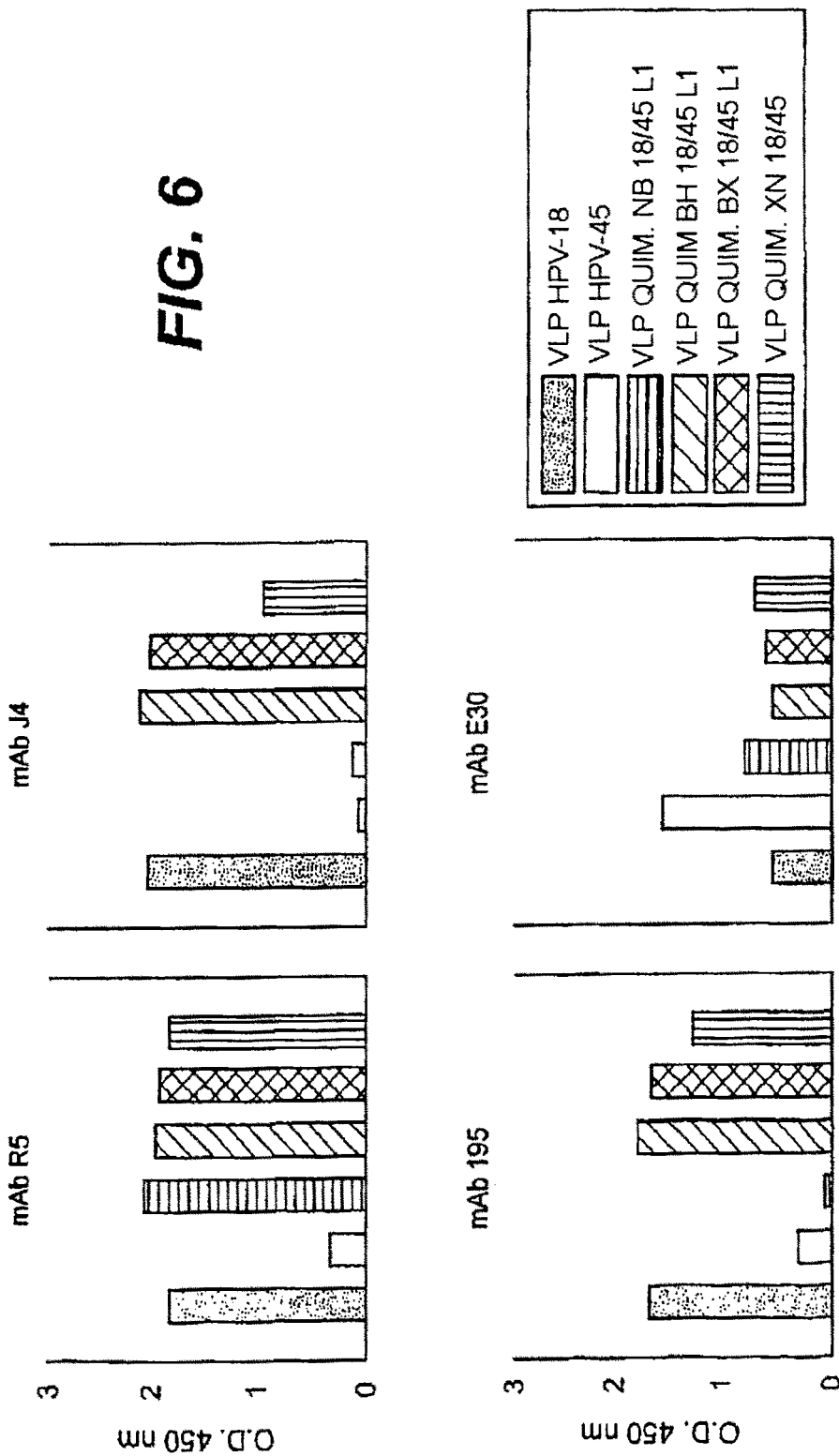


FIG. 5

FIG. 6



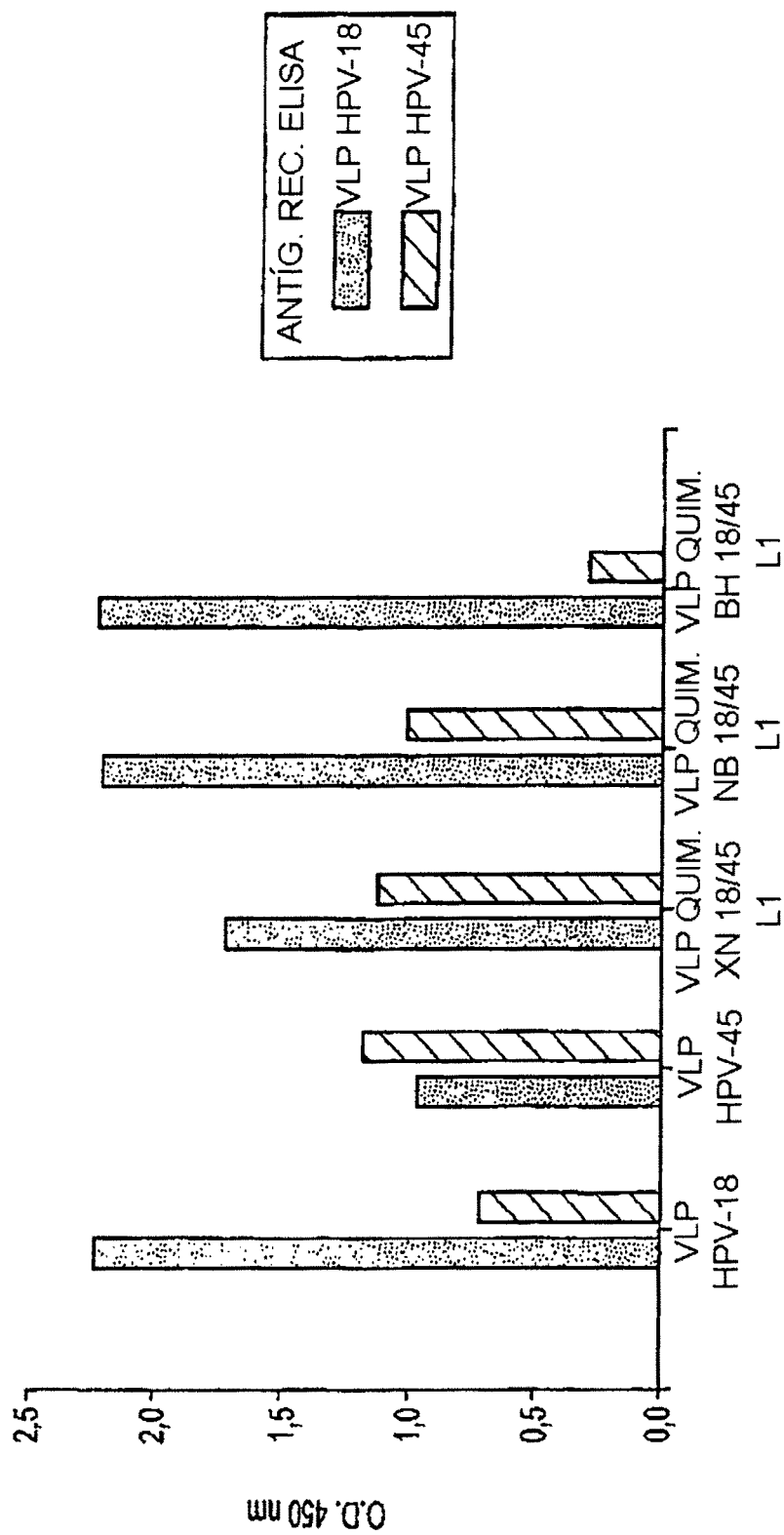


FIG. 7

ES 2 301 551 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MEDIMMUNE, INC.

5 <120> Moléculas L1 de Papilomavirus Humano (HPV) Quiméricas y Usos de las Mismas

<130> 44595ep/AW/hs

10 <140> EP 01942170.0

<141> 12-06-2001

<150> PCT/US01/18774

15 <151> 12-06-2001

<150> US60/212.839

<151> 21-06-2000

20 <160> 26

<170> Microsoft Word

25 <210> 1

<211> 22

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de PCR

35 <400> 1

gactccaacg acgcagagaa ac

22

40 <210> 2

<211> 21

<212> ADN

45 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de PCR

50 <400> 2

gtccacaatg ctgcttctcc g

21

55 <210> 3

<211> 22

<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de PCR

65

ES 2 301 551 T3

	<400> 4	
	tccacagtgt ccaggtcgtg t	21
5	<210> 5	
	<211> 34	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
15	<400> 5	
	cagatcagat ctatggcttt gtggcggcct agtg	34
20	<210> 6	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
30	<400> 6	
	tatgcaagct tacttctctgg cacgtacacg cac	33
35	<210> 7	
	<211> 33	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
45	<400> 7	
	ccatagagat ctatggcttt gtggcggcct agt	33
50	<210> 8	
	<211> 33	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
60	<400> 8	
	aagcgaagct tatttcttac tacgtatacg tac	33
65	<210> 9	
	<211> 33	

ES 2 301 551 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 9	
10	ccatagagat ctatggcctt gtggcggcct agt	33
	<210> 10	
15	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 10	
25	caagaatcta gaactgcctg catgataaaa	30
	<210> 11	
30	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 11	
40	aggcagttct agattattaa ctgtaggcaa	30
	<210> 12	
45	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 12	
55	actaaaatcc atggcccat aacctgtatc cac	33
	<210> 13	
60	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> cebador de PCR	

ES 2 301 551 T3

	<400> 13	
	ttggccatgg attttagtac attgcagg	28
5	<210> 14	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
15	<400> 14	
	aagcgaagct tattttcttac tacgtatacg tac	33
20	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
30	<400> 15	
	gttggtgatg tgggtgaagt gtga	24
35	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
45	<400> 16	
	gtccacaatg ctgcttctcc g	21
50	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
60	<400> 17	
	gaattgagct agtagaaagc t	21
65	<210> 18	
	<211> 21	

ES 2 301 551 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 18	
10	tccacagtgt ccaggtcgtg t	21
	<210> 19	
15	gagcttacag tagagagctc g	21
	<210> 20	
20	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 20	
30	tgttaccact acacactttc cttc	24
	<210> 21	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 21	
45	gcagaggacc ttagaacact a	21
	<210> 22	
50	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 22	
60	gaacacagga gagggttgtg c	21
	<210> 23	
65	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 301 551 T3

	<220>	
	<223> cebador de PCR	
5	<400> 23	
	gaacccaag gccaacgcg a	21
10	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador de PCR	
20	<400> 24	
	ccacacagag tactgcgct cagg	24
25	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador de PCR	
35	<400> 25	
	gatgaccag atcatgttg	20
40	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador de PCR	
50	<400> 26	
	ggagcaatga tctgatctt c	21
55		
60		
65		