



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 787**

51 Int. Cl.:
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98942011 .2**
86 Fecha de presentación : **19.08.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1015561**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2000**

54 Título: **Método *in vitro* de desmontaje/reensamblaje de partículas similares a virus (VLP) de papilomavirus.**

30 Prioridad: **05.09.1997 US 923997**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **MEDIMMUNE, Inc.**
35 West Watkins Mill Road
Gaithersburg, Maryland 20878, US

72 Inventor/es: **McCarthy, Michael, P. y**
Suzich, JoAnn

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 268 787 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

Método *in vitro* de desmontaje/reensamblaje de partículas similares a virus (VLP) de papilomavirus.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona un medio muy eficaz de desmontaje de partículas similares a virus de papilomavirus (VLP) en el interior de capsómeros y/o subunidades más pequeñas y de reensamblaje en el interior de las VLP. Estas composiciones que contienen VLP reensambladas producidas por la invención expresan epítomos neutralizantes de la configuración y presentan gran homogeneidad y por consiguiente comprenden agentes para diagnóstico y profilácticos eficaces para el diagnóstico o la prevención de la infección por papilomavirus. Asimismo, la presente invención se refiere a la utilización de dichas VLP para la encapsulación de las fracciones deseadas, p. ej., agentes para diagnóstico o terapéuticos y a la utilización de los mismos como “pseudoviriones” para la evaluación de la eficacia de las supuestas vacunas o productos terapéuticos.

15 **Antecedentes de la invención**

Los papilomavirus infectan una extensa variedad de diferentes especies de animales incluyendo el hombre. La infección se caracteriza típicamente por la producción de tumores epiteliales y fibroepiteliales benignos o verrugas en la zona de la infección. Cada especie de vertebrado está infectada por una serie específica para la especie de papilomavirus, que comprende varios tipos diferentes de papilomavirus. Por ejemplo, se han aislado más de sesenta genotipos diferentes de papilomavirus humano (HPV). Los papilomavirus son agentes muy infecciosos específicos para la especie. Por ejemplo, los papilomavirus canino y de conejo no pueden producir papilomas en especies heterólogas tales como la humana. La inmunidad neutralizante para la infección contra un tipo de papilomavirus generalmente no comunica inmunidad contra otro tipo, aun cuando los tipos infecten una especie homóloga.

En el hombre, los papilomavirus producen verrugas genitales, una enfermedad frecuente transmitida por vía sexual. Los tipos de HPV 6 y 11 son los más frecuentemente asociados con los condilomas genitales de las verrugas genitales benignas. Las verrugas genitales son muy frecuentes, y la infección por HPV asintomática o inapreciable es aun más frecuente que la infección clínica. Aunque la mayoría de las lesiones producidas por HPV son benignas, las lesiones que surgen de determinados tipos de papilomavirus, p. ej., HPV-16 y HPV-18, pueden experimentar evolución maligna. Además, la infección por uno de los tipos de papilomavirus relacionado con el cáncer se considera que es un factor de riesgo significativo en el desarrollo del cáncer de cuello uterino, segundo cáncer más frecuente en mujeres en todo el mundo. De los genotipos de HPV implicados en el cáncer de cuello uterino, HPV-16 es el más frecuente, encontrándose aproximadamente en el 50% de los cánceres de cuello uterino.

A la vista de los riesgos sanitarios significativos planteados por la infección de papilomavirus generalmente, y de la infección por papilomavirus humano en particular, varios grupos han descrito el desarrollo de antígenos de papilomavirus recombinante y su utilización como agentes de diagnóstico y como vacunas profilácticas. En general, dicha investigación ha estado centrada en la producción de vacunas profilácticas que contienen la proteína (L1) del cápsido mayor sola o en combinación con la proteína menor (L2) del cápsido. Por ejemplo, Guim *et al.*, *Virology*, 190:548-552 (1992), describió la expresión de la proteína L1 del HPV-1, utilizando una expresión de vacuna en células Cos, que presenta epítomos de configuraciones y la utilización de los mismos como vacuna o para la tipificación o detección serológica. Este trabajo consiste también en la base de una solicitud de patente, US n° de serie 07/903.109, presentada el 25 de junio de 1992 (abandonada a favor de la US n° de serie 08/216.506, presentada el 22 de marzo de 1994), que ha sido autorizada por el cesionario de la presente solicitud. Asimismo, Suzich *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11553-11557 (1995), describen que la inmunización de cánidos con un papilomavirus oral canino recombinante (COPV) expresado en un sistema celular de baculovirus/insecto impidió completamente el desarrollo de papilomavirus víricos de la mucosa. Estos resultados son importantes dadas las similitudes significativas entre muchos HPV y COPV. Por ejemplo, COPV, similar a los HPV asociados al cáncer anogenital y genital, infecta y produce lesiones en una zona de la mucosa. Asimismo, las secuencias L1 de COPV comparten similitudes estructurales con las secuencias L1 del HPV. Dadas estas similitudes, el modelo COPV/sabueso es útil para la investigación de las vacunas que contienen la proteína L1, p. ej., la investigación de la respuesta inmunoprotectora, la protección de la infección natural y la optimización de protocolos de vacunación. (*id.*).

Asimismo, un grupo de investigación de la Universidad de Rochester describió la producción de la proteína (L1) del cápsido mayor del papilomavirus humano y partículas similares a virus utilizando un sistema de expresión de baculovirus/célula de insecto (Rose *et al.*, Universidad de Rochester, documento WO 94/20137, publicado el 15 de septiembre de 1994). En especial, describieron la expresión de la proteína L1 del cápsido mayor de HPV-6 y de HPV-11 y la producción de partículas similares a virus de HPV-6, HPV-11, HPV-16 y HPV-18.

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

Todavía más, un grupo de investigación del gobierno de los Estados Unidos describió las proteínas del cápsido del papilomavirus recombinante susceptibles de autoensamblaje en estructuras de capsómero y de cápsidos víricos que comprenden epítomos con configuración antigénica (patente US n° 5.437.951, Lowy *et al.*, publicada 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 susceptible de autoensamblaje y utilización de la misma para expresar los cápsidos del HPV-16 recombinante que contienen dicha proteína L1 del HPV-16.

5 Con respecto a las vacunas que contienen la proteína del cápsido del HPV, está ampliamente aceptado por los expertos en la materia que un requisito previo necesario de una vacuna eficaz a base de la proteína L1 del cápsido mayor del HPV es la de la proteína L1 presente en los epítomos de configuración expresados por las proteínas mayores del cápsido del papilomavirus humano natural (véase, p. ej., Hines *et al.*, *Gynecologic Oncology*, 53:13-20 (1994); Suzich *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11553-11557 (1995)).

10 Las proteínas L1 del HPV recombinante en forma tanto de partículas como de partículas que presentan epítomos de L1 del HPV con configuración natural han sido descritas en la bibliografía. Es sabido que L1 es estable en varias configuraciones oligoméricas, p. ej., (i) capsómeros que comprenden pentámeros de la proteína L1 y (ii) cápsidos que están constituidos por setenta y dos capsómeros en una estructura de icosaedro T=7. Asimismo, es sabido que cuando la proteína L1, se expresa en células eucarióticas por sí misma, o en combinación con L2, es susceptible de ensamblarse de manera eficiente en estructuras de tipo cápsido generalmente denominadas partículas víricas (VLP).

15 Se ha publicado que las VLP son morfológica y antigénicamente similares a los viriones auténticos. Además, se ha publicado que la inmunización con las VLP provoca la producción de anticuerpos neutralizantes del virus. Más específicamente, los resultados con una variedad de papilomavirus animales (el papilomavirus bucal canino y el papilomavirus-4 bovino) han sugerido que la inmunización con las VLP produce protección contra la infección por papilomavirus correspondiente. Por consiguiente, las VLP compuestas de proteínas L1 del HPV se han propuesto como vacunas para prevenir las enfermedades asociadas a infecciones por papilomavirus humano.

25 Por ejemplo, se ha publicado que la proteína L1 puede ensamblarse en las VLP cuando se expresa utilizando baculovirus recombinante y vectores víricos de vacuna en levadura recombinante (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)).

30 Las preparaciones preliminares de L1 recombinante aisladas de células eucarióticas han producido una población variable de VLP que se aproximan a 55 nm de diámetro, que son similares en aspecto a los viriones intactos. Sin embargo, el montaje de VLP es algo sensible al tipo de célula. Por ejemplo, la L1 expresada en *Escherichia coli* se expresa en gran medida en forma de capsómeros o más pequeños, con pocos o ningún cápsido apreciable en la célula o en la purificación (Rose *et al.*, *J. Virol.*, 67:1936-1944 (1993); Li *et al.*, *J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)). Resultados similares se observan cuando la proteína VP1 del poliomavirus se expresa en *E. coli* (Salunke *et al.*, *Biophys. J.*, 56:887-900 (1989)).

40 Hasta la fecha, no se ha publicado un método eficaz *in vitro* para el desmontaje cuantitativo y posterior reensamblaje de VLP de papilomavirus. Dicho método presentaría muchas ventajas ya que en potencia permitiría la preparación de las VLP de papilomavirus más estables y/o homogéneas. Esto sería beneficioso ya que la homogeneidad y estabilidad son ambas de interés significativo en la preparación y caracterización de vacunas durante su elaboración. Además, la capacidad para desmontar y reensamblar las VLP tiene importantes aplicaciones en la purificación de VLP. Las proteínas L1 de HPV expresadas en células eucarióticas se montan espontáneamente para formar las VLP, como se expuso anteriormente. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos de purificación de proteínas han sido diseñados para purificar proteínas mucho más pequeñas que las de ~20 millones de daltons, la VLP de 55 nm. El potencial para desmontar las VLP extraídas de células eucarióticas a nivel de los capsómeros de L1 o más pequeños, purifica los componentes más pequeños por técnicas convencionales y a continuación el reensamblaje para formar las VLP en la etapa deseada del proceso de purificación es muy potente, y actualmente está siendo utilizado en la purificación de las VLP de HPV-16_{Tr}, como se expuso anteriormente (compuestos por una forma mutada de la proteína L1 del HPV-16 en la que se han eliminado los 34 aminoácidos del terminal C). Por último la capacidad para desmontar y reensamblar las VLP *in vitro* permite la encapsulación de los compuestos exógenos deseados dentro de la VLP reensamblada.

55 Los intentos preliminares en el desmontaje de la VLP del papiloma han incluido experimentos basados en el trabajo preliminar basado en el poliomavirus, un papovavirus relacionado, en el que se demostró que tanto la reducción de los disulfuros como la quelación de los cationes eran esenciales para el desmontaje del virión (Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977)). Sin embargo, en el caso de las VLP del HPV se ha demostrado que las concentraciones bajas de agente reductor (DTT 1 a 10 mM) que proporcionan poliomavirus óptimo en forma desmontada en presencia de bajas concentraciones de agentes quelantes (p. ej., EGTA de 0,5 a 10 mM) fueron sólo ligeramente eficaces en el desmontaje de las VLP de papilomavirus (véase la Tabla 1, Li *et al.*, *J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)). Por contraste, se ha publicado que las VLP L1 de HPV-11 parcialmente tripsinizadas se disocian de manera eficaz en dichas condiciones (Li *et al.*, *J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)). Sin embargo, esto presenta inconvenientes ya que la utilización de la proteasa puede producir efectos desfavorables, p. ej. eliminación de epítomos neutralizantes.

65 Asimismo, Sapp y colaboradores demostraron que este "desmontaje parcial" de las VLP de HPV-33 podría conseguirse mediante el tratamiento con agente reductor solo (DTT 20 mM). Sin embargo, la ampliación de la degradación de VLP no se determinó (Sapp *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 76:2407-2412 (1995)).

Como se expuso anteriormente, el montaje del cápsido de HPV requiere la proteína L1 plegada correctamente. Sin embargo, no han sido bien aclarados factores adicionales significativos para la formulación y estabilidad de VLP. Con respecto a esto, se sabe generalmente que el montaje de VLP puede ser efectuado por numerosos factores. Por ejemplo, los factores y condiciones conocidos que afectan al montaje por otros virus incluyen, a título de ejemplo:

5 pH, fuerza iónica, modificaciones tras la traducción de las proteínas del cápsido vírico, enlaces disulfuro y enlace de catión divalente, entre otros. Por ejemplo, la importancia del enlace catiónico, específicamente del calcio, en el mantenimiento de la integridad del virión se ha demostrado para el poliomavirus (Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977)) y rotovirus (Gajardo *et al.*, *J. Virol.*, 71:2211-2216 (1997)). Asimismo, los enlaces disulfuro parecen ser significativos para la estabilización del poliomavirus (Walter *et al.*, *Cold Spring Har. Symp. Quant. Biol.*, 39:255-257 (1975); Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977)); y los virus SV40 (Christansen *et al.*, *J. Virol.*, 21 :1079-1084 (1977)). También, es sabido que los factores tales como el pH y la fuerza iónica influyen en la estabilidad del cápsido del poliomavirus, afectando supuestamente las interacciones electrostáticas (Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977); Salunke *et al.*, *Cell*, 46:895-904 (1986); Salunke *et al.*, *Biophys. J.*, 56:887-900 (1980)). Asimismo, es sabido que las modificaciones del cápsido vírico tras la traducción de algunas proteínas pueden afectar la estabilidad del cápsido y el montaje, p. ej.; glicosilación, fosforilación y acetilación (Garcea *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3613-3617 (1983); Xi *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 72:2981-2988 (1991)). Por lo tanto, existen numerosos factores interrelacionados que pueden afectar la estabilidad del cápsido, el montaje y el desmontaje que varían ampliamente incluso para los virus relacionados.

20 Por consiguiente, hay necesidad en la materia de aclarar los factores que afectan el montaje y desmontaje de la VLP del papilomavirus. Además, basándose en esto, hay necesidad en la materia de un método eficaz *in vitro* de desmontaje y montaje de las VLP de papilomavirus que dé como resultado las VLP que presentan buenas propiedades de homogeneidad, estabilidad e inmunógenas, es decir, las que presentan epítopos con configuración y más especialmente neutralizantes en la superficie de viriones naturales e intactos de papilomavirus. Además, hay necesidad significativa de métodos para el desmontaje y reensamblaje de las VLP de papilomavirus que obvian los problemas del desmontaje parcial de VLP y que impiden la utilización de la proteasa utilizada en los métodos anteriores de generación de las VLP de papilomavirus.

Objetivos de la invención

30 Por lo tanto, un objetivo de la invención consiste en resolver los problemas de la técnica anterior.

Más específicamente, un objetivo de la invención consiste en proporcionar un método nuevo de desmontaje y reensamblaje de las VLP de papilomavirus.

35 Todavía más específicamente, un objetivo de la invención consiste en proporcionar un método nuevo de desmontaje y reensamblaje de las VLP de papilomavirus humano.

40 Asimismo un objetivo de la invención consiste en proporcionar un método que permita el desmontaje y montaje cuantitativos de las VLP de papilomavirus en grandes cantidades.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar composiciones que contienen VLP de papilomavirus, preferentemente composiciones que contienen VLP de papilomavirus humano de mejor calidad, p. ej., mejor homogeneidad, inmunogenicidad y/o estabilidad.

45 Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un medio mejorado de purificación de VLP incorporando el desmontaje/reensamblaje de VLP en el procedimiento de purificación.

Todavía otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un método para la encapsulación de las fracciones deseadas en las VLP de papilomavirus, p. ej. agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar las VLP de papilomavirus, preferentemente VLP de papilomavirus humano, que contienen los agentes terapéuticos o de diagnóstico deseado contenidos en éstas, p. ej., agentes anticancerosos o agentes antivíricos.

55 Todavía otro objetivo de la invención consiste en generar "pseudoviriones" para los tipos de virus del HPV en los que las cantidades recuperables de viriones del HPV no están actualmente disponibles mediante la encapsulación de compuestos exógenos en las VLP de HPV construidas utilizando las proteínas L1 y L1/L2 de dicho papilomavirus de HPV, en particular un ADN correspondiente al genoma de dicho HPV o un fragmento del mismo, o un ADN que codifica a un marcador seleccionable tal como β -galactosidasa.

Todavía otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un nuevo método de suministro de una fracción deseada, p. ej. un ADN a las células deseadas en el que el vehículo de administración de dicha fracción, p. ej., ADN de cadena transcrita o complementaria, comprende una VLP de papilomavirus.

65 Todavía otro objetivo de la presente invención consiste en utilizar pseudoviriones basados en las VLP del HPV en un ensayo *in vitro* para probar la eficacia de las vacunas potenciales del HPV que prueba la capacidad de los

anticuerpos neutralizantes para inhibir la inserción de un ADN encapsulado en el interior de las células infectadas normalmente por dicho HPV.

Breve descripción de la invención

5

Por consiguiente, la invención se refiere generalmente a un nuevo método para el desmontaje y reensamblaje de las VLP de papilomavirus, preferentemente de las VLP de papilomavirus humano *in vitro*.

10

La presente invención proporciona un método para producir una composición que contiene una partícula similar a un virus de papilomavirus (VLP), método que comprende las etapas siguientes:

15

(i) desmontaje de una composición que contiene la partícula similar a virus (VLP) tratando dicha composición que contiene partícula similar a virus con una solución que comprende un agente reductor sulfhidrilo para desmontar dichas VLP; y

20

(ii) reensamblaje de dichas VLP desmontadas mediante la eliminación u oxidación del agente reductor sulfhidrilo, en la que dichas VLP reensambladas son susceptibles de producir anticuerpos neutralizantes del virus.

25

Como se expuso anteriormente, las VLP del papilomavirus están constituidas principalmente por una proteína L1 estructural, que es estable como los capsómeros o los cápsidos pentaméricos compuestos de 72 capsómeros. Dichas VLP pueden comprender además la proteína L2. En especial, mediante la elección juiciosa de las condiciones experimentales, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el desmontaje cuantitativo de las VLP de papilomavirus (casi completamente a nivel de los capsómeros o más pequeño), y el reensamblaje posterior pueden conseguirse regularmente mediante la exposición prolongada de las VLP, a una solución que comprende una alta concentración de por lo menos un agente reductor sulfhidrilo contenida preferentemente en tampones de fuerza iónica moderada a baja. Específicamente, el presente método produce composiciones que contienen VLP reensamblada de homogeneidad muy elevada, principalmente que comprenden partículas en el intervalo de las VLP de tamaño natural, por término medio $56,5 \pm 7,0$ nm ($n=15$) con muy pocas VLP montadas parcialmente o complejos más pequeños. Los rendimientos son también muy altos, es decir, cuantitativos, por término medio 80 a 90% en relación con la proteína L1 total a partir del material de partida para las VLP reensambladas en condiciones óptimas de desmontaje. Además, esencialmente todos los capsómeros disociados anteriormente se reensamblan para producir las VLP de tamaño natural solubles y filtrables.

30

35

Se ha descubierto de forma inesperada que la utilización de dichas condiciones produce composiciones de VLP de papilomavirus de mayor homogeneidad (en comparación con el material de partida de VLP y con las composiciones de VLP disponibles), es decir, composiciones homogéneas constituidas casi completamente por las VLP de papilomavirus que son 150 S, de 55 nm. Además, se ha demostrado que estas VLP homogéneas presentan epítomos de HPV de configuración neutralizantes, un requisito previo de una vacuna profiláctica eficaz a base de VLP del HPV. Además, los inventores han descubierto de forma sorprendente que los quelantes no aumentan el desmontaje de la VLP, y además pueden inhibir el reensamblaje de los capsómeros en las VLP. Como se expone con más detalle a continuación, estos descubrimientos fueron sorprendentes debido a que se ha demostrado para un poliomavirus, relacionado con el papovavirus, que tanto la exposición a concentraciones bajas de agente reductor sulfhidrilo como la quelación de los iones cálcicos, fueron esenciales para el desmontaje del virión. En cambio, dichas condiciones fueron sólo ligeramente eficaces para el desmontaje de las VLP del papiloma.

40

45

50

Como se indicó, se ha descubierto también que el capsómero del papilomavirus y las composiciones de VLP, producidos según la invención presentan epítomos específicos para la estructura (configuracionales), en particular neutralizantes descubiertos en la superficie de los viriones de papilomavirus intactos. Esto se ha demostrado tanto por su reactividad con los anticuerpos neutralizantes como con los anticuerpos monoclonales del papilomavirus anti-L1 específicos de la estructura en un análisis ELISA y por su capacidad para producir la síntesis de anticuerpos que neutralizan la infección por el virus del papilomavirus en un ensayo de infección RT-PCT. Por consiguiente, éstos son muy apropiados para su utilización como agentes profilácticos para prevenir la infección por PV y con fines de diagnóstico. Además, los presentes métodos para el desmontaje y reensamblaje de VLP pueden aplicarse en diferentes grados de pureza de VLP. Esto permite el desmontaje de mezclas en bruto de las VLP, la purificación de los componentes más pequeños de las VLP solubles (que es más sencillo debido a su tamaño muy reducido) seguido del reensamblaje en la etapa deseada del proceso de purificación.

55

60

Además, como se expone con mayor detalle a continuación, los presentes métodos proporcionan además la introducción de fracciones deseadas, p. ej. ADN, proteínas, péptidos, hormonas, radionucleidos, agentes anticancerosos y agentes antivíricos en las VLP durante el reensamblaje. Esto presenta ventajas ya que dichas VLP pueden utilizarse como vehículos de administración (para la inserción de las fracciones deseadas en las células) y como "pseudoviriones" para evaluar la eficacia profiláctica de las vacunas de papilomavirus.

65

Los presentes inventores suponen que el desmontaje de la VLP del papilomavirus requiere exposición prolongada a concentraciones muy elevadas de agente reductor debido a la presencia de enlaces disulfuro estabilizantes que probablemente están ocultos e inaccesibles y a que la exposición de estos enlaces al disolvente por fluctuaciones estructurales locales es muy infrecuente. (Este fenómeno se expone con mayor detalle en la solicitud n° de serie 08/888.050,

ES 2 268 787 T3

presentada el 3 de julio de 1997). Aparentemente, en la exposición prolongada a concentraciones elevadas de agente reductor y a una fuerza iónica baja a moderada, estos enlaces se vuelven accesibles a lo largo del tiempo.

Definiciones

5

Proteína del cápsido mayor o proteína L1

Ésta se refiere a la proteína estructural del papilomavirus (PV) que constituye la parte principal de la estructura del cápsido PV. Esta proteína ha presentado aplicación en la preparación de las vacunas contra el HPV y como agente de diagnóstico.

10

Proteína del cápsido menor o proteína L2

Ésta se refiere a la proteína estructural del papilomavirus que constituye una parte menor de la estructura del cápsido vírico de PV.

15

Partículas víricas o VLP

Éstas se refieren a las estructuras de tipo cápsido que dan como resultado la expresión y montaje de una secuencia de ADN de L1 del papilomavirus sola o en combinación con una secuencia de ADN de la L2. Las VLP son morfológica y antigénicamente similares a los viriones auténticos. Las VLP pueden producirse *in vivo*, en células huésped adecuadas, p. ej. células huésped de mamífero y de insecto o pueden formarse espontáneamente durante la purificación de las proteínas L1 recombinantes.

20

Pseudovirión

Éste se refiere a las VLP, que contienen compuestos marcadores exógenos, compuestos por las proteínas L1 o L1 y L2 de un tipo de PV específico. Los pseudoviriones pueden utilizarse para demostrar la eficacia de sustancias, tales como anticuerpos, para bloquear la unión vírica específica y/o absorberse en células diana en los casos en los que el virus auténtico no esté disponible.

30

Proteína L1 plegada correctamente

Ésta se refiere a la proteína L1 (ya sea monomérica, en forma de pequeños oligómeros (dímeros a tetrameros) o capsómeros), que está en una configuración adecuada para el reensamblaje en las VLP y que conserva los epítomos presentes en los cápsidos víricos o las VLP.

35

Capsómeros

Estos se refieren a una configuración oligomérica de la proteína L1 que está constituida por pentámeros de L1.

40

Cápsidos

Estos se refieren a la fracción estructural del papilomavirus que está compuesta por capsómeros. Más específicamente, está constituida por setenta y dos capsómeros en una estructura de icosaedro T=7.

45

Epítomo de HPV de L1 configuracional

Éste se refiere a un epítomo expresado en la superficie de la proteína L1 plegada correctamente que se expresa también mediante la proteína L1 de un HPV infeccioso natural correspondiente. Está muy aceptado por los expertos en la materia que la presentación de los epítomos configuracionales es esencial para la eficacia (tanto de agentes profilácticos como de diagnóstico) de inmunógenos de la proteína L1 del HPV.

50

Epítomo de HPV de L1 neutralizante configuracional

Éste se refiere a un epítomo expresado en la superficie de la proteína plegada correctamente que se expresa también mediante la proteína L1 de un HPV infeccioso natural correspondiente y que produce anticuerpos neutralizantes. Está muy aceptado por los expertos en la materia que la presentación de los epítomos neutralizantes configuracionales es esencial para la eficacia (tanto de agentes profilácticos como de diagnóstico) de inmunógenos de la proteína L1 del HPV.

55

60

Anticuerpo configuracional

Éste se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un epítomo expresado en la proteína L1 plegada correctamente pero no en la proteína L1 desnaturalizada.

65

Solución de alta concentración del agente reductor

Ésta se refiere a una solución que contiene una cantidad de por lo menos un agente reductor sulfhidrido, p. ej., glutatión, β -mercaptoetanol o ditioneitol que proporciona al menos el 70% de desmontaje de las VLP de papilomavirus, cuando las VLP están en contacto con éste durante periodos prolongados, típicamente por lo menos 2 horas, y más preferentemente por lo menos 16 horas. La concentración del agente reductor puede variar dependiendo del agente reductor en concreto. En el caso del β -mercaptoetanol, esta cantidad preferentemente será por lo menos el 1% en peso, más preferentemente por lo menos del 3 al 5% en peso. En el caso del ditioneitol, la cantidad preferentemente será por lo menos aproximadamente 100 mM.

Exposición prolongada o puesta en contacto de las VLP con solución de agente reductor de alta concentración

Ésta se refiere al tiempo que las VLP se ponen en contacto con la solución del agente reductor de concentración elevada que es suficiente para proporcionar durante por lo menos el 70% del desmontaje de las VLP en los capsómeros. Preferentemente, dicha exposición prolongada producirá el desmontaje entre el 70 y el 90% y de manera óptima prácticamente el desmontaje completo del VLP. Este tiempo variará para diferentes tipos de PV, y puede depender también de las células en las que las VLP se expresan (material de partida), grado de pureza (presencia o ausencia de aglomerados), pH y fuerza iónica. Además, las VLP formadas a partir de la proteína L1 mutada o alterada químicamente, p. ej., la proteína L1 truncada en el terminal C, puede desmontarse en condiciones suaves. Generalmente, esta exposición será durante por lo menos 2 horas (en el caso de las VLP de HPV-16_{T_r}), y de forma más típica durante más tiempo, es decir, por lo menos 12 horas, más preferentemente por lo menos 16 horas (en el caso de las VLP de HPV-11).

Descripción detallada de las figuras

Figura 1: Análisis por SDS/PAGE de la proteína L1 purificada del HPV-11. Se mezcló la proteína con muestra de tampón de preparación en ausencia (banda 1) o presencia (banda 2) de DTT 2 mM y se hirvió durante 2 minutos antes de la electroforesis en gel. A la izquierda se presentan las posiciones en las que migran los patrones de peso molecular (en Da $\times 10^{-3}$).

Figura 2: Análisis con gradiente de sacarosa al 30% del desmontaje de la VLP del HPV-11. Se trataron preparaciones de HPV-11 a 4°C como se describe en el texto, y se tomaron muestras en la superficie (T) o el fondo (B) del gradiente de sacarosa antes de la electroforesis en gel. Grupo 1, material de partida de la VLP del HPV-11 no tratado, purificado en PBS. Grupo 2, VLP incubadas con β ME al 5% durante 16 horas. Grupo 3, VLP incubadas con β ME al 5% durante 1 hora. Grupo 4, VLP incubadas con β ME al 2% durante 16 horas. Grupo 5 VLP incubadas con β ME al 0,5% durante 16 horas. Grupo 6, VLP incubadas con DTT 10 mM y EDTA 5 mM durante 16 horas.

Figura 3: Análisis con gradiente de sacarosa lineal del 5 al 20% del desmontaje de las VLP del HPV-11. Se incubaron las VLP en PBS con β ME al 5% (a), o NaHCO₃ 200 mM, pH 9,6 (b) durante 16 horas a 4°C y a continuación se centrifugaron en un gradiente de sacarosa lineal del 5 al 20% tal como se describió en el texto. Se recogió el gradiente en 25 fracciones (0,5 ml) y el sedimento (P) se volvió a poner en suspensión en 0,5 ml de PBS. Se presenta una inmunotransferencia que demuestra la posición de la proteína L1 en todo el gradiente. Asimismo se indican las posiciones de los picos a las que migraron los patrones de sedimentación cuando se efectúan en gradientes por separado.

Figura 4: Análisis con gradiente de sacarosa lineal del 10 al 65% de las VLP del HPV-11 en varios estados de ensamblado. Una alícuota del material de partida de la VLP purificado (a) se incubó con β ME al 5% durante 16 horas a 4°C (b). Una fracción de las VLP tratadas con β ME se reensamblaron a continuación por diálisis en PBS-NaCl 0,5 para eliminar el agente reductor (c). Las muestras se centrifugaron a continuación en gradientes de sacarosa lineal del 10 al 65% tal como se describió en el texto. Cada gradiente se recogió en 12 fracciones (1 ml), y el sedimento (P) se volvió a poner en suspensión en 1 ml de PBS. Se muestran inmunotransferencias que demuestran las posiciones en las que la proteína L1 migró en los diferentes gradientes. También se indica las posiciones de los picos a las que migraron los patrones de sedimentación, como en la Fig. 3.

Figura 5: Microfotografías electrónicas de las VLP del HPV-11 en varios estados del ensamblado. Las VLP, tratadas como se describe, se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2%, se aplicaron a las rejillas y se fotografiaron con ampliaciones de 15 a 25.000 veces. A, material de partida de VLP purificado, b, VLP desmontadas a nivel de capsómeros por incubación con β ME al 5% durante 16 horas a 4°C. c, VLP reensambladas a partir de las VLP desmontadas por diálisis en PBS-0,5 NaCl, d, zona central de la imagen c a mayor ampliación. Barra de escala: a,c = 200 nm; b,d = 100 nm.

Figura 6: Reacción de las VLP intactas y desmontadas con anticuerpos monoclonales específicos de la estructura del HPV-11. Material de partida (A) de la L1 VLP del HPV-11, VLP desmontadas por tratamiento con β ME al 5% sin (B) o con (C) diálisis posterior en PBS-NaCl 0,5 M para eliminar el agente reductor, y VLP desmontadas en presencia de carbonato 200 mM, pH 9,6 y a continuación dializada en PBS-NaCl 0,5 M (D) se adhirieron a los pocillos de placa de microvaloración. Anticuerpos H11.F1 monoclonales específicos de la estructura del HPV-11 (HPV-11 neutralizantes; ∇) y H11.A3 (HPV-11 no neutralizantes; \bullet) se analizó la inmunorreactividad para los antígenos ligados en un ELISA tal como se describió en Materiales y Métodos. Reactividad con anticuerpo monoclonal AU1(\blacksquare), que

reconoce un epítipo lineal hallado en L1 del HPV-11, se utilizó como referencia para demostrar la adherencia del antígeno a los pocillos de microvaloración.

Figura 7: Comparación de la capacidad de los anticuerpos producidos contra las VLP del HPV-11 purificadas iniciales, y las VLP reensambladas, para neutralizar el virus HPV-11. Se incubaron sueros de anti-HPV-11 con viriones de HPV-11 durante 60 min a 37°C antes de la adición a las células HaCaT. Alternativamente, se añadieron viriones a las células sin preincubación con suero. Seis días después de la infección, se recogieron las células y se extrajo el ARN completo. El diez por ciento de ARN completo se utilizó para la transcripción inversa, y el diez por ciento del ADNc resultante se utilizó a continuación como plantilla para la PCR anidada utilizando cebadores específicos para el mensaje empalmado E1[^]E4 del HPV-11. Se separaron los productos de la PCR en geles de agarosa al 2%. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se examinó a la luz UV la presencia de la banda E1[^]E4 de ~0,6 kb (a). Ampliación por PCR de β -actina se realizó en todas las muestras de ADNc como referencia interna (b). Las dimensiones esperadas de la banda de β -actina son ~0,6 kb. La banda S contiene marcadores de tamaño molecular. La banda C representa las reacciones llevadas a cabo con ARN procedente de las células incubadas sin virus y la banda V representa las células incubadas con virus que no habían sido preincubadas con suero. Como es de esperar, la banda E1[^]E4 se detecta en las células infectadas por virus pero no en las no infectadas. Las bandas siguientes contienen productos de PCR procedentes de las células infectadas con virus que habían sido preincubadas con diluciones log₁₀ en serie de antisuero del anti-HPV-11 (10⁻³-10⁻⁷) producidos contra las VLP del HPV-11 purificadas iniciales y tal como se indicó.

Figura 8: Comparación de SDS-PAGE VLP del HPV-16_{Tr} en los estados ensamblado (- β ME) y desmontado (+ β ME serie 2), lo que indica la mayor pureza de las VLP purificadas en estado desmontado. La posición en la que la proteína L1 del HPV-16_{Tr} migra es indicada por la flecha.

Figura 9: Análisis en gradiente de sacarosa lineal del 5 al 20% de las VLP del HPV-16_{Tr} desmontadas. Se incubaron las VLP en PBS de + β ME serie 2 finales purificadas (véase Tabla 3) con β ME al 4% durante 16 horas a 4°C y a continuación se centrifugaron en un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20% como se describió en el apartado Métodos. Se recogió el gradiente en 25 fracciones (0,5 ml) y se volvió a poner en suspensión el sedimento (P) en 0,5 ml de PBS. Se muestra una inmunotransferencia, sondada con anticuerpo 16-E monoclonal específico del HPV-16, que demuestra la posición de la proteína L1 en todo el gradiente. Se indica asimismo las posiciones de los picos a las que migraron los patrones de sedimentación cuando se realizaron en gradientes independientes.

Figura 10: Análisis con gradiente de sacarosa lineal del 10 al 65% de las VLP del HPV-16_{Tr} en varios estados de ensamblado. Una alícuota de (a) material de partida de la VLP purificado (+ β ME serie 2; Tabla 3) se incubó con β ME al 4% durante 16 horas a 4°C (b). Una fracción de las VLP tratadas con β ME se reensamblaron a continuación por diálisis en PBS-NaCl 0,5 M para eliminar el agente reductor (c). Las muestras se centrifugaron a continuación en gradientes de sacarosa lineal del 10 al 65% tal como se describió en el texto. Cada gradiente se recogió en 12 fracciones (1 ml), y el sedimento (P) se volvió a poner en suspensión en 1 ml de PBS. Se muestran inmunotransferencias sondadas con anticuerpo monoclonal 16E específico para HPV-16 que demuestran las posiciones en las que la proteína L1 migró en los diferentes gradientes. También se indican las posiciones de los picos a las que migraron los patrones de sedimentación, como en la Fig. 9.

Descripción detallada de la invención

Como se expuso, la presente invención se refiere generalmente a un método nuevo que proporciona el desmontaje muy eficaz de las VLP de papilomavirus, es decir, por lo menos el 70% del desmontaje, más preferentemente entre el 70 y el 90% de desmontaje, y lo más preferentemente el desmontaje total de la VLP, que comprende la exposición prolongada de las VLP del papilomavirus compuestas de L1 o una combinación de proteínas L1 y L2 con una solución de agente reductor sulfhidrido de alta concentración. En general, la concentración de agente reductor será por lo menos del 1% en peso, y más preferentemente aproximadamente del 3 al 5% en peso, en donde la solución que contiene el agente reductor preferentemente tiene una fuerza iónica que es como máximo aproximadamente el 0,5 y preferentemente inferior.

Sin embargo, las concentraciones de agente reductor y la fuerza iónica pueden oscilar para diferentes tipos de papilomavirus, para las células huésped de las que se obtienen, para las formas mutadas y/o alteradas químicamente de la proteína L1, y para la pureza. Más específicamente, los presentes inventores han explicado las condiciones para el desmontaje máximo de las VLP purificadas *in vitro*, que proporciona el ensamblaje ulterior eficaz. Se ha descubierto que la incubación prolongada de las VLP de papilomavirus con concentraciones relativamente elevadas de agentes reductores a fuerzas iónicas que son por lo menos del 0,5 M, y más preferentemente de aproximadamente la fuerza iónica fisiológica o inferior, es tanto necesaria como suficiente para generar capsómeros homogéneos solubles a partir de las VLP purificadas. Además, se ha observado que durante la eliminación o alternativamente por oxidación del agente reductor, se obtiene una población definida de VLP intactas, de dimensiones apropiadas.

Esto se ha demostrado en especial utilizando las VLP del HPV-11 producidas en un sistema de células de baculovirus/insecto, es decir, en células de *Trichoplasia ni* (High Five[®]) infectadas con un baculovirus recombinante que contiene la secuencia completa del ADN de L1 del HPV-11. Sin embargo, basándose en estos resultados, es razonable sacar la conclusión de que se conseguirán resultados similares utilizando las VLP de papilomavirus producidas a partir de otros tipos y especies, en particular de otros tipos de papilomavirus humano. Esto es razonable ya que se

ha demostrado que numerosas proteínas L1 de papilomavirus producen las VLP cuando se expresan en sistemas de vector de expresión recombinante adecuados.

Asimismo, es razonable esperar que se consigan similares resultados utilizando las VLP de papilomavirus compuestas de una combinación de proteínas L1 y L2, ya que parecen prácticamente idénticas a las VLP compuestas únicamente de proteínas L1. [Sin embargo, suponiendo que L2 desempeñe una función estabilizante significativa, los presentes inventores admiten que el desmontaje puede requerir la utilización de concentraciones mayores de agente reductor, exposición más prolongada a éste, pH elevado y/o fuerza iónica reducida durante el desmontaje]. Además, es de esperar que los presentes métodos sean adecuados para el desmontaje/montaje de las VLP obtenidas de cualquier sistema de células huésped que den como resultado la producción de las VLP de papilomavirus. Aunque los solicitantes admiten que existen algunas diferencias de las células huésped, como se expuso anteriormente, se han descrito muchas células huésped para expresar las VLP de papilomavirus en forma de VLP.

En general, el material de partida de VLP deseado se producirá en un sistema de célula huésped adecuado, p. ej., un sistema baculovirus/célula de insecto y se extraerá del mismo utilizando métodos conocidos. La técnica de extracción dependerá de factores tales como las células huésped específicas utilizadas, de si la proteína continúa siendo intracelular o es segregada, entre otros factores.

El desmontaje de las VLP puede realizarse a diferentes niveles de pureza de VLP. Cuando se realiza junto con la purificación, las VLP se extraerán de las células, desmontadas, purificadas por técnicas convencionales, y se volverán a montar en el grado de pureza deseado. En los casos en los que se utilizan las VLP para encapsular compuestos exógenos, o cuando se realice el desmontaje, reensamblaje para mejorar la homogeneidad del producto final, las VLP utilizadas serán de pureza bastante elevada. En estos casos, las VLP utilizadas para el desmontaje estarán comprendidas preferentemente por lo menos entre el 10 y el 30% en peso, más preferentemente del 50% en peso, y lo más preferentemente por lo menos entre el 70 y el 90% en peso. Los métodos de determinación de la pureza de VLP son bien conocidos e incluyen los métodos densitométricos SDS-PAGE.

Como se expone con detalle a continuación en la sección Materiales y Métodos, los presentes inventores desarrollaron un análisis de identificación rápida para el estudio del desmontaje de VLP que utiliza un sistema en gradiente de sacarosa. En este sistema, las VLP intactas sedimentan en todo un gradiente en sacarosa al 30%, mientras que los capsómeros no aglomerados, los oligómeros de L1 o los monómeros de L1 más pequeños se quedan en la parte superior del gradiente. Por consiguiente, este método de análisis es de utilidad ya que facilita la identificación precisa de las condiciones que producen el desmontaje máximo de VLP.

En general, se ha descubierto que el desmontaje máximo de VLP requiere exposición prolongada de las VLP no aglomeradas a una solución que contiene una concentración elevada de agente reductor sulfhidrido. Como se explicó anteriormente, la exposición prolongada es la duración suficiente para producir por lo menos el 70% de desmontaje de las VLP, más preferentemente entre el 70 y 90% de desmontaje de VLP y de manera ideal prácticamente el desmontaje total de VLP. En el caso de las VLP L1 de HPV-11 recombinantes producidas en el sistema de células de insecto del ejemplo, el desmontaje máximo tuvo lugar después de aproximadamente 16 horas a 4°C (utilizando una solución que contenía el 5% en peso de β -mercaptoetanol). Sin embargo, dichos tiempos de exposición en potencia pueden reducirse utilizando otros materiales de partida de VLP, condiciones de pH diferentes, concentraciones de agente reductor superiores y fuerzas iónicas inferiores. Por ejemplo, se ha observado [resultados no mostrados] que el desmontaje sustancial de las VLP formadas por una forma truncada en el terminal C de la proteína L1 del HPV-16 puede efectuarse por exposición de dichas VLP con una solución de β -mercaptoetanol (4%) después de aproximadamente 2 horas a 4°C.

El presente método de desmontaje de la VLP se ha demostrado que es eficaz utilizando β -mercaptoetanol y ditiotreitól como agentes reductores. Sin embargo, es de esperar que otros agentes conocidos proporcionen resultados similares. Ejemplos de agentes reductores adecuados útiles en la invención comprenden glutatión, β -mercaptoetanol, ditiotreitól, ditioueritritól, cisteína, sulfuro de hidrógeno y mezclas de los mismos.

Como se advierte, el presente método pone en contacto las VLP con una solución que presenta una concentración de agente reductor sulfhidrido elevada. En la presente memoria, ésta se define como una concentración de agente reductor que produce el desmontaje sustancial de las VLP, es decir, por lo menos del 70%, preferentemente por lo menos entre el 70 y el 90% y más preferentemente en la práctica el desmontaje total de las VLP, tras exposición prolongada.

Estas concentraciones elevadas de agente reductor variarán dependiendo de los agentes reductores o de la combinación en concreto. En el caso del β -mercaptoetanol, se ha descubierto que una concentración de por lo menos el 5% en peso (713 mM) produce el desmontaje de la VLP L1 del HPV-11 óptimo a la fuerza iónica fisiológica. Concentraciones inferiores de agente reductor y periodos de exposición reducidos producen un desmontaje de VLP menos eficaz. Por ejemplo, se ha descubierto que las soluciones de β -mercaptoetanol al 4% también proporcionan un desmontaje eficaz (por lo menos del 70%).

Se ha descubierto asimismo que la fuerza iónica es un parámetro importante en el método de desmontaje. Preferentemente, el desmontaje se efectuará utilizando una solución con una fuerza iónica que es como máximo del 0,5, y preferentemente inferior, más preferentemente el desmontaje se efectuará a aproximadamente la fuerza iónica “fi-

siológica” (es decir, NaCl 0,15 M) o inferior. Se ha descubierto que las fuerzas iónicas superiores hacen al método de desmontaje de VLP menos eficaz. En general, la fuerza iónica será como máximo aproximadamente del 0,5, más preferentemente como máximo aproximadamente de 0,25 y lo más preferentemente como máximo aproximadamente de 0,15.

Se ha descubierto también que la presencia de aglomeración de VLP presenta efectos desfavorables en el desmontaje. Este efecto puede evitarse mediante la eliminación del material aglomerado, o en potencia puede evitarse mediante la exposición más prolongada de las VLP a la solución de agente reductor de concentración elevada. Esto sucede probablemente porque los enlaces disulfuros están ocultos y por lo tanto inaccesibles al agente reductor en los aglomerados, impidiendo de este modo el desmontaje.

Asimismo, como se expuso, se ha descubierto sorprendentemente que los quelantes, incluso a concentraciones elevadas, no presentan un efecto significativo en el desmontaje de VLP del HPV-11. Esto se demostró utilizando tanto EGTA como EDTA, ambos quelantes bien conocidos, solos o en combinación con ditiotreitol. Como se expuso anteriormente, esto es sorprendente porque los agentes quelantes se ha descrito que son necesarios en el desmontaje de VLP para un papovavirus citado.

Además, se ha descubierto que el tampón de carbonato (NaHCO_3 0,2 M, pH 9,6) produjo el desmontaje significativo de las VLP del HPV-11. Sin embargo, a diferencia del desmontaje producido por exposición prolongada a los agentes reductores sulfhidrilo, no fue posible reensamblar las VLP tratadas con carbonato. Se supone que el tratamiento con carbonato desnaturalizó parcialmente la proteína L1. Esto demuestra que únicamente aquellos métodos (tales como la exposición prolongada a concentraciones eficaces de agentes reductores sulfhidrilo), que desmontan las VLP mientras que conservan la estructura de la proteína L1 plegada correctamente producirán material que es competente para reensamblarse en VLP, solubles, de tamaño natural.

Como se advierte, el desmontaje en cuestión de las VLP del HPV-11 produce capsómeros de gran homogeneidad que presentan epítomos neutralizantes con configuración como se demostró mediante su reactividad con anticuerpos monoclonales con configuración y neutralizantes producidos contra un papilomavirus determinado (HPV-11 del ejemplo). Además, en condiciones óptimas, el presente método produce una composición en la que las VLP parecen estar totalmente descompuestas en capsómeros. Por el contrario, el presente desmontaje de las VLP del HPV-16_{T₁} produce una mezcla de capsómeros, oligómeros de L1 más pequeños y monómeros de L1. Sin embargo, esta mezcla de oligómeros de L1 es también susceptible de reensamblaje cuantitativo. Esto indica que el método en cuestión proporciona la proteína L1 plegada correctamente, en forma de capsómeros, oligómeros L1 más pequeños, o monómeros L1, que es competente para el reensamblaje de VLP.

Como se expuso, una ventaja determinada de la invención consiste en que estos capsómeros pueden montarse a continuación de forma cuantitativa en las VLP simplemente mediante la eliminación de la solución del agente reductor. La eliminación del agente reductor puede llevarse a cabo por varios métodos, p. ej., diálisis o cromatografía en columna. Alternativamente, la adición de oxidantes en exceso puede favorecer en potencia la nueva formación de los enlaces disulfuro apropiados, conduciendo al reensamblaje de VLP. Como se expuso anteriormente, el reensamblaje está afectado por la integridad estructural del material de partida de la proteína L1 plegada correctamente. Asimismo, la solubilidad del material de partida afecta el reensamblaje, ya que el material aglomerado no se reensambla cuantitativamente.

En general, el reensamblaje estará afectado por la eliminación del agente reductor sulfhidrilo o por la adición de oxidantes y exposición del material de partida de la proteína L1 plegada correctamente a las condiciones de fuerza iónica superior, p. ej., al menos aproximadamente 0,5 o superior. Las concentraciones salinas superiores funcionan para estabilizar las VLP. Sin embargo, la adición de agentes quelantes tiene el efecto opuesto, es decir, inhibe de forma moderada el reensamblaje.

Sorprendentemente, dicho reensamblaje produce las VLP que son mucho más homogéneas en tamaño de partícula que el material de partida original de VLP. Esto se demostró por comparación del material VLP de partida y del producto VLP reensamblado en gradientes de sacarosa lineal del 10 al 65%, y por examen al microscopio electrónico. Principalmente, se detectaron las partículas comprendidas en el intervalo de las VLP de tamaño natural, por término medio $56,5 \pm 7,0$ nm con muy pocas VLP ensambladas parcialmente o complejos visibles menores. Asimismo, los rendimientos son muy elevados, por término medio aproximadamente entre el 80 y el 90% con relación a la proporción de proteína L1 total a partir del material de partida a las VLP reensambladas utilizando condiciones de reensamblaje óptimas. Esencialmente, todo el material de partida desmontado parece reformar las VLP solubles, filtrables y de tamaño natural. Asimismo, estas VLP presentan epítomos neutralizantes con configuración observados en la superficie de viriones de papilomavirus auténticos y producen anticuerpos neutralizantes de manera tan potente como el material de partida de VLP.

Aunque estos resultados son nuevos e inesperados, no obstante es de esperar, basándose en lo dado a conocer en la solicitud, que un experto en la materia pueda conseguir rendimientos mayores de VLP variando la concentración de proteínas, pH, fuerza iónica y/o la cinética.

Como se expuso, la presente invención proporciona además métodos para producir las VLP de papilomavirus que

ES 2 268 787 T3

han encapsulado en su interior una fracción o fracciones deseadas. Esto generalmente se realizará mediante las etapas siguientes:

- 5 (i) obtener las VLP de un papilomavirus deseado, que están constituidas por L1 o una combinación de las proteínas L1 y L2;
- (ii) desmontar dichas VLP al poner en contacto dichas VLP con una solución que contiene una gran concentración de agente reductor sulfhidrido que posee una fuerza iónica que es como máximo 0,5;
- 10 (iii) poner en contacto las VLP desmontadas con una solución que contiene una fracción que debe encapsularse en su interior, y opcionalmente que contiene también proteína L2 purificada (p. ej., si las VLP desmontadas no comprendían la proteína L2); y
- 15 (iv) reensamblar dichas VLP desmontadas mediante la eliminación del agente reductor sulfhidrido o por adición de oxidante en exceso, produciendo de este modo las VLP que contienen la fracción(es) deseada(s).

Las etapas de desmontaje y de montaje se realizan como se describió anteriormente, es decir, el desmontaje se efectúa mediante la utilización de grandes concentraciones de agentes reductores sulfhidrido, típicamente por lo menos el 1% en peso, o superiores, y durante periodos prolongados, es decir, por lo menos 2 horas, y típicamente más, p. 20 ej., por lo menos 16 horas. Como se expuso, el tiempo de exposición y la concentración del agente reductor están afectados por el tipo de las VLP de papilomavirus, el sistema de células huésped en el que se producen, las mutaciones dentro de la proteína L1 (p. ej., los truncamientos C-terminales), el nivel de pureza, si están presentes aglomerados y en potencia si las VLP están compuestas de L1 o una combinación de L1 y L2. El reensamblaje tiene lugar durante la eliminación u oxidación del agente reductor sulfhidrido.

25 Como se expuso anteriormente, aunque es razonable suponer que las VLP compuestas por L1 y L2 se desmontarán en condiciones similares a las de VLP basadas en L1, la proteína L2 puede servir una función de estabilización. Por consiguiente, el desmontaje de las VLP compuestas de L1 y L2 puede requerir en potencia concentraciones mayores de agente reductor, exposición más prolongada a éste, fuerza iónica reducida, elevado pH o una combinación de las 30 mismas. Alternativamente, las VLP constituidas enteramente por proteínas L1 de PV pueden desmontarse como se da a conocer en la presente memoria y la proteína L2 purificada (reducida por métodos recombinantes) puede añadirse durante la etapa de reensamblaje.

35 Las fracciones que pueden estar encapsuladas en las VLP incluyen fracciones terapéuticas y de diagnóstico, p. ej., secuencias de ácidos nucleicos, ribonucleidos, hormonas, péptidos, agentes antivíricos, agentes antitumorales, agentes moduladores del crecimiento celular, inhibidores del crecimiento celular, citocinas, antígenos, toxinas, etc.

Las presentes VLP, que contienen una fracción encapsulada deseada en su interior, en la administración a un huésped deseado, preferentemente humano, serían absorbidas por células infectadas normalmente por el papilomavirus 40 específico, p. ej., células epiteliales, queratinocitos, etc., proporcionando de este modo la interiorización potencial de dicha fracción encapsulada dentro de estas células. Esto puede facilitar la utilización de las VLP en cuestión para la terapia (al contrario que los profilácticos) porque permite la administración de un agente terapéutico en un punto de la célula deseado, p. ej. un punto del cáncer de cuello uterino. Dada la minuciosidad de los PV en general, esta puede proporcionar un método muy selectivo de administración de las fracciones deseadas a las células diana. Por ejemplo, 45 puede proporcionar un método de administración de secuencias de ácido nucleico, p. ej., un ADN que codifique un polipéptido terapéutico o una secuencia de cadena complementaria.

La fracción o fracciones encapsuladas, desde luego, no deberían afectar desfavorablemente el montaje de VLP y/o la estabilidad. Éste puede determinarse produciendo las VLP que contienen la fracción deseada y evaluando sus 50 efectos, si existen, sobre el montaje y/o la estabilidad de la VLP.

En el caso de los ADN o ARN, la secuencia nucleica encapsulada puede ser de hasta 8 kilobases, tamaño del genoma del PV. Sin embargo, típicamente la secuencia encapsulada será más pequeña, p. ej. del orden de 1 a 2 55 kilobases. Típicamente, estos ADN codificarán un polipéptido deseado, p. ej., polipéptido terapéutico, tal como una enzima, hormona, factor de crecimiento, etc. Esta secuencia además estará ligada funcionalmente a las secuencias que facilitan la expresión de la misma en las células huésped a las que se dirige.

Otra aplicación de las VLP que contienen ADN encapsulados es como “pseudoviriones”. A este respecto, nu- 60 merosos papilomavirus, incluyendo los implicados en enfermedades humanas, son raros, no pueden propagarse fácilmente *in vitro* y no pueden purificarse fácilmente a partir de fuentes de células humanas en cantidades que faciliten su utilización en ensayos de neutralización de anticuerpos. Esto es problemático, ya que impide o dificulta la evaluación de la viabilidad de las vacunas o agentes terapéuticos para la protección contra estos virus HPV especí- 65 ficos. Ejemplos de tipos de HPV para los que actualmente no hay existencias disponibles incluyen HPV-31, 33, 35 y 45.

La presente invención debería evitar o por lo menos reducir dichos problemas. Esencialmente, los “pseudoviriones” se construirán correspondiendo a estos virus que comprenden la VLP que están constituidos por L1 o una combinación

de las proteínas L1 y L2 del PV concreto, y encapsulados además en ésta parte del genoma de dicho papilomavirus o un ADN que codifica un marcador seleccionable.

5 El pseudovirión se utilizará en un ensayo de “infectividad” de la célula *in vitro* para evaluar la eficacia de las vacunas correspondientes de VLP. Esencialmente, éste se efectuará poniendo en contacto las células con dichos pseudoviriones. Estos pseudoviriones se unirán a dichas células y proporcionarían la inserción de dicho ADN. A continuación, la inserción de dicho ADN puede evaluarse por métodos conocidos, p. ej., métodos de hibridación de PCR, o basados en la expresión del marcador seleccionable, p. ej., β -galactosidasas.

10 Ésta se efectuará tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos generados contra las proteínas L1 o L2 específicas para el HPV específico. Si la inserción se inhibe, como se determina, p. ej., basándose en la expresión reducida del marcador seleccionable, ésta es una indicación de que la proteína L1 o L2 provocaba la producción de anticuerpos neutralizantes del virus.

15 La presente invención es aplicable a la producción de las VLP por cualquier papilomavirus y en particular por cualquier papilomavirus humano. Muchos ADN con L1 y L2 de HPV se han publicado en la bibliografía y están disponibles públicamente (véase, p. ej., Baker, Sequence Analysis of Papillomavirus, *Genomes*, págs. 321-384; Long *et al.*, patente US n° 5.437.931, Cole *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 193:599-608 (1987); Danos *et al.*, *EMBO J.*, 1:231-236 (1982); Cole *et al.*, *J. Virol.*, 38 (3): 991-995 (1986)). Además, es bien sabido que los ADN de L1 del HPV presentan homología significativa. Por consiguiente, un ADN de L1 del HPV deseado puede obtenerse fácilmente, p. ej. mediante la utilización de un ADN de L1 del HPV publicado anteriormente o un fragmento del mismo como sonda de hibridación o como cebador durante la ampliación de la reacción en cadena de polimerización (PCR). De hecho, numerosos ADN de L1 del HPV se han clonado y expresado.

25 Preferentemente, dicho ADN de L1 del HPV en la presente invención procederá de un HPV que está implicado en el cáncer o las verrugas genitales, p. ej., HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52 y HPV-56 están implicados en el cáncer, y HPV-6, HPV-11, HPV-30, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-55 y HPV-70, están implicados en verrugas. Sin embargo, las presentes VLP homogéneas pueden producirse a partir de cualquier ADN de L1 del HPV deseado.

30 En general, la L1 del HPV seleccionado y opcionalmente las secuencias de L2 se expresarán en un sistema de célula huésped recombinante deseado y se utilizarán para producir las VLP del HPV para desmontaje.

35 El huésped y el vector de expresión seleccionados se cultivarán en condiciones que favorezcan la producción de las VLP. Esto depende en gran medida del sistema de huésped seleccionado y de las secuencias reguladoras contenidas en el vector, p. ej., si la expresión requiere inducción. Tras la expresión, las VLP del HPV se extraerán de las células huésped. Los medios de extracción dependerán también en alguna medida del sistema huésped/vector.

40 Por ejemplo, si se selecciona un vector de expresión intracelular, las células huésped necesitarán ser lisadas y las VLP del HPV recuperadas del lisado. En cambio, si el vector de expresión contiene secuencias que facilitan la secreción, las VLP del HPV se recuperarán directamente del medio de cultivo. Los métodos para la recuperación de proteínas heterólogas de las células huésped recombinantes y del método de cultivo son bien conocidas en la materia.

45 Las secuencias de L1 del HPV pueden expresarse en cualquier célula huésped que proporcione la expresión de rendimientos recuperables de las VLP del HPV. Los sistemas de huésped adecuados para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidos e incluyen, a título de ejemplo, bacterias, células de mamífero, levaduras, y células de insecto. Un sistema de expresión preferido comprende el sistema baculovirus/célula de insecto utilizado en los ejemplos ya que este sistema proporciona grandes rendimientos en proteína. Sin embargo, las proteínas L1 y L2 del HPV pueden producirse en otros sistemas, en especial de bacterias y levaduras.

50 Los vectores adecuados para la clonación de la expresión de las secuencias de ADN que codifican L1 del HPV son bien conocidos en la materia y están disponibles en el mercado. Además, las secuencias reguladoras adecuadas para conseguir la clonación y la expresión, p. ej., activadores, secuencias de poliadenilación, potenciadores y marcadores seleccionables son asimismo bien conocidos. La selección de secuencias apropiadas para obtener rendimientos de proteína recuperables es rutinaria para un experto en la materia.

55 Las VLP han dado cuenta de la aplicación en las vacunas profilácticas del HPV y de los diagnósticos. Los capzómeros producidos por desmontaje pueden también ser útiles, ya que se ha descubierto que presentan epítomos con figuración neutralizante y producen anticuerpos neutralizantes. Las presentes VLP pueden presentar ventajas a esto debido a su aumento de homogeneidad, y en potencia, estabilidad.

60 Como se expuso, la presente invención debe ser extensamente aplicable a cualquier secuencia de L1 del HPV. Existen una variedad de tipos de HPV conocidos en la materia. Además, tipos particulares de HPV están asociados a infecciones específicas tales como verrugas planas, verrugas cutáneas, epidermodisplasia verruciforme, lesiones y cáncer de cuello uterino. Más de 60 tipos diferentes de HPV han sido identificados en lesiones clínicas mediante estudios de homología de la secuencia del nucleótido vírico. Véase, por ejemplo, Jenson *et al.*, en: Belshe, R. ed., Textbook of human virology, segunda edición, MASS:PSG, 1989:951 y Kremsdorf *et al.*, *J. Virol.*, 52:1013-1018

(1984). El tipo HPV determina, en parte, el punto de infección, las propiedades patológicas y el aspecto clínico así como el curso clínico de la lesión respectiva.

Debido a que se cree que existe poca o ninguna inmunidad cruzada para los tipos de HPV y a que la inmunidad a la infección es específica del tipo HPV, será necesario producir las VLP del HPV recombinante para cada tipo específico de HPV en el que se necesita protección o tratamiento. Sin embargo, debido a la homología entre las proteínas L1 y los genes, pueden utilizarse técnicas de hibridación para aislar el gen L1 específico de interés. Las sondas de nucleótido seleccionadas a partir de las zonas de la proteína L1 que se ha demostrado que presentan homología de secuencia, pueden utilizarse para aislar otros genes de L1. Se conocen en la materia métodos de hibridación (véase, por ejemplo, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985); *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Maniatis *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982); y *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Alternativamente, pueden utilizarse métodos de PCR para ampliar genes o fragmentos de gen de L1 (véase, p. ej., las patentes US n° 4.683.195; n° 4.683.202 y n° 4.800.159).

Pueden aislarse también partículas víricas para un tipo de papilomavirus específico, el ADN clonado y las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de L1 aisladas. Los métodos para el aislamiento de partículas víricas y la clonación de los ADN víricos han sido descritos (véase, p. ej., Heilman *et al.*, *J. Virology*, 36:395-407 (1980); Beaudenon *et al.*, *Nature*, 321:246-249 (1986); Georges *et al.*, *J. Virology*, 51:530-538 (1984); Kremsdorf *et al.*, *J. Virology*, 52:1013-1018 (1984); Clad *et al.*, *Virology*, 118:254-259 (1982); DeVilliers *et al.*, *J. Virology*, 40:932-935 (1981); y la solicitud de patente europea 0.133.123).

Alternativamente, puede aislarse la proteína L1 para un papilomavirus humano específico, determinarse la secuencia de aminoácidos y construirse las sondas de ácido nucleico basadas en la secuencia de ADN prevista. Dichas sondas pueden utilizarse en el aislamiento del gen de L1 de un banco del ADN del papilomavirus (véase, p. ej., Suggs *et al.*, *PNAS*, 78(11):6613-6617 (1981) y Young y Davis, *PNAS*, 80:1194 (1983)).

Como se expuso la formación de VLP es algo sensible al tipo de célula en el que se efectúa la expresión. Por consiguiente, presenta ventaja seleccionar sistemas que produzcan grandes cantidades de VLP como material de partida para el desmontaje de la VLP. Generalmente, el sistema de expresión comprenderá un vector con la proteína L1 de interés y las zonas reguladoras apropiadas así como una célula huésped adecuada.

Como se expuso, se utilizan preferentemente vectores de baculovirus. Un sistema de baculovirus ofrece la ventaja de que puede producirse un gran porcentaje de células para expresar la proteína debido a la utilización de la infección en lugar de técnicas de transfección. Aunque el baculovirus es un virus de insecto y se desarrolla en células de insecto (Sf9), estas células conservan muchos mecanismos eucarióticos para el tratamiento de proteínas incluyendo la glucosilación y la fosforilación que pueden ser importantes para generar proteínas de configuración apropiada. Los sistemas de vector de baculovirus son conocidos en la técnica (véase, p. ej., Summers y Smith, *Texas Agricultural Experimental Bulletin*, n° 1555 (1987); Smith *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 3:2156-2165 (1985); Posse, *Virus Research*, 5:4359 (1986); y Matsuura, *J. Gen. Virol.*, 68:1233-1250 (1987)). Asimismo, se ha publicado que las células infectadas por baculovirus expresan proteínas L1 del HPV que presentan la configuración apropiada.

Para la expresión en un sistema de expresión apropiado, un gen de L1 o un gen de L1 modificado está ligado funcionalmente en un vector de expresión y se introduce en una célula huésped que permita la expresión de la proteína L1 por esta célula. El gen con las zonas reguladoras apropiadas será proporcionado en la orientación propia y el marco de lectura que permita la expresión. Los métodos para la construcción del gen son conocidos en la materia (véase, en especial, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY (1989)), y las referencias citadas en la presente memoria.

Puede emplearse una amplia variedad de secuencias de transcripción y reguladoras. Las señales pueden proceder de focos víricos, en los que las señales reguladoras están asociadas a un gen determinado que presenta un alto grado de expresión. Es decir, se utilizarán activadores fuertes, por ejemplo, de procedencia vírica o de mamífero. De esta manera, las condiciones óptimas para llevar a cabo la invención incluyen la clonación del gen de L1 en un vector de expresión que sobreexpresará los epítomos neutralizantes del virus, dependientes de la configuración de la proteína L1 en células diana transfectadas o infectadas.

La idoneidad de las VLP del HPV producidas según la invención como vacunas o como agentes de diagnóstico se confirma mediante la reacción con anticuerpos o anticuerpos monoclonales que reaccionan o reconocen los epítomos de configuración presentes en el virión intacto y basados en la capacidad para provocar la producción de antisuero neutralizante. Los ensayos adecuados que determinan si los anticuerpos neutralizantes se producen son conocidos por los expertos en la materia. Ésta es una característica esencial de las VLP del HPV que deben utilizarse en las vacunas contra el HPV. De esta manera, puede verificarse si las VLP del HPV provocarán la producción de anticuerpos neutralizantes anti-HPV. Por lo tanto, para su utilización en la invención pueden probarse otros vectores de expresión y sistemas de expresión.

Como se expuso, las VLP de la presente invención pueden utilizarse para detectar, diagnosticar, serotipar y tratar la infección por papilomavirus. Cuando se utilizan para el diagnóstico o la serotipia, las VLP según la invención pueden marcarse utilizando alguno de entre una variedad de marcadores y métodos de marcaje. Ejemplos de tipos de

ES 2 268 787 T3

marcadores que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, marcadores enzimáticos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos no radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de toxina y marcadores quimioluminiscentes.

5 Ejemplos de marcadores enzimáticos adecuados incluyen la malato hidrogenasa, estafilococo nucleasa, delta-5-esteroide isomerasa, levadura-alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, perglucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, acetil colinesterasa, etc.

10 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 .

15 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 de fluorescamina, etc.

20 Ejemplos de marcadores de toxina adecuados comprenden la toxina de la difteria, ricino y toxina del cólera. Ejemplos de marcadores quimioluminiscentes comprenden 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 eucorina, etc.

25 Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse según la presente invención. El enlace de estos marcadores a las VLP puede realizarse utilizando técnicas normalizadas conocidas habitualmente por los expertos en la materia. Las técnicas típicas están descritas 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 mencionadas en esta última son el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de la dimaleimida, el método del éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida, todos estos métodos están incorporados en la presente memoria como referencia.

30 La detección de los anticuerpos anti-HPV que utilizan las presentes VLP puede mejorarse mediante la utilización de portadores. Los portadores bien conocidos comprenden vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetitas. La naturaleza del portador puede ser soluble en alguna medida o insoluble en aras de la presente invención. Los expertos en la materia advertirán muchos otros portadores adecuados para el enlace de las proteínas, o serán capaces de determinar los mismos mediante la utilización de la experimentación de rutina.

35 El aspecto más importante de la presente invención, sin embargo, conlleva el desarrollo de las vacunas contra el PV. Las vacunas de la invención contendrán una cantidad de las VLP del HPV presente suficiente para provocar la formación de anticuerpos neutralizantes en el huésped contenido en un portador farmacéuticamente aceptable.

40 La administración de las vacunas que contienen la presente VLP puede efectuarse por cualquier medio farmacéuticamente aceptable, p. ej., por vía parenteral, local o generalizada, incluyendo, a título de ejemplo, la administración oral, intranasal, intravenosa, intramuscular y tópica. El modo de administración depende de factores que incluyen la vía natural de infección. La dosis administrada dependerá de los factores que incluyen la edad, salud, peso, clase de tratamiento simultáneo, si existe, y naturaleza y tipo del papilomavirus específico humano. La vacuna puede emplearse en forma farmacéutica tales como cápsulas, soluciones líquidas, suspensiones o elixires, para administración oral, o formulaciones líquidas esterilizadas tales como soluciones o suspensiones para utilización parenteral o intranasal. Se utiliza preferentemente un portador inerte, inmunológicamente aceptable, tal como solución salina o solución salina tamponada con fosfato.

50 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 dosis comprendidas entre aproximadamente 0,1 mg de proteína y aproximadamente 20 mg de proteína, más generalmente entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 100 mg de proteína. Pueden administrarse dosis aisladas o múltiples.

55 El método de la presente invención hace posible la preparación de las VLP del HPV que contienen vacunas para prevenir la infección por papilomavirus. Además, siguiendo los métodos de la invención, pueden prepararse vacunas para cualquier papilomavirus específico humano.

60 Dado que puede estar asociado más de un tipo de PV a las infecciones por PV, las vacunas pueden comprender las VLP del HPV estable procedentes de más de un tipo de PV. Por ejemplo, dado que HPV 16 y 18 están asociados a carcinomas del cuello uterino, por consiguiente una vacuna para la neoplasia de cuello uterino puede comprender las VLP del HPV 16; del HPV 18 o de ambos HPV 16 y 18.

65 De hecho, se conocen una variedad de neoplasias por estar relacionadas con infecciones por PV. Por ejemplo, las HPV 3a y 10 se han relacionado con verrugas planas. Se ha descrito que numerosos tipos de HPV están asociados con epidermodisplasia verrugiforme (EV) incluyendo las HPV 3a, 5, 8, 9, 10 y 12. Se ha publicado que las HPV 1, 2, 4 y 7 están relacionadas con las verrugas cutáneas y las HPV 6b, 11a, 13 y 16 están relacionadas con las lesiones de las membranas mucosas (véase, por ejemplo, Kremsdorf *et al.*, *J. Virol.*, 52:1013-1018 (1984); Beaudenon *et al.*, *Nature*,

ES 2 268 787 T3

321:246-249 (1986); Heilman *et al.*, *J. Virol.*, 36:395-407 (1980); y DeVilliers *et al.*, *J. Virol.*, 40:932-935 (1981)). Por lo tanto, las presentes formulaciones de la vacuna pueden comprender una mezcla de las VLP reensambladas procedentes de diferentes tipos de HPV dependiendo de la protección deseada.

5 Como se indica, las VLP del HPV de la invención pueden utilizarse también para serotipia y para la incorporación en kits de serotipia.

Para experimentación serológica, los kits comprenderán las presentes VLP del HPV y medios de detección tales como sustratos enzimáticos, anticuerpos marcados y similares.

10

Una vez descrita en general la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a título de ilustración y no se pretende que sean limitativos a menos que se especifique de otro modo.

Ejemplos

15

Se utilizaron los materiales y métodos siguientes en los Ejemplos.

Materiales y Métodos

20 *VLP del HPV-11*

Para su utilización en los estudios de desmontaje y reensamblaje de VLP utilizando proteína pura, las proteínas L1 del HPV-11 se expresaron de manera heteróloga en células *Trichoplusia ni* (High Five[®]) infectadas con baculovirus recombinante que codifica el marco de lectura abierto de L1 completo corriente abajo del activador polihedrina tal como se describe (Ghim *et al.*, en M. A. Stanley (ed.) *Immunology of human papillomaviruses*, Plenum, Nueva York, pág. 147-153 (1993)). Se recogieron las células 72 horas aproximadamente después de la infección, se sedimentaron por centrifugación y se congelaron. Para la preparación de las VLP, la pasta celular se volvió a poner en suspensión en tampón de homogenización (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contiene 10 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de aprotinina y 1 µg/ml de pepstatina A) y se lisaron en un microfluidizador (modelo HC8000/3A de Microfluidics). El lisado homogeneizado se centrifugó a continuación a 100.000 × g durante 90 minutos y el sedimento que contenía las VLP del HPV-11 se volvió a poner en suspensión en PBS que contenía CsCl (405 g/l). El lisado clarificado se centrifugó a continuación durante la noche a 83.000 × g y se recogió la banda de VLP. Las VLP se diluyeron en PBS-NaCl 0,5 M y se estratificaron en todo un gradiente de la etapa de dos componentes compuesto del 30% y 63% de sacarosa. Los gradientes se centrifugaron a 167.000 × g durante 3 horas y la banda de VLP purificada se recogió en la interfase entre el 30% y el 63% de las soluciones de sacarosa. Las VLP se dializaron a continuación en tampones seleccionados (bien PBS, o PBS con NaCl añadido hasta una concentración final de 0,3 M o 0,5 M) y se almacenaron a 4°C. Se determinó la concentración de proteína por el análisis de Bradford (Bradford *et al.*, *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976)) utilizando albúmina de suero bovino como proteína de referencia y se determinó el contenido de L1 tal como se describe (Suzich *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11553-11557 (1995)). Partiendo de 25 a 30 g de pasta celular húmeda, el protocolo anterior proporcionó 15 a 25 mg de las VLP del HPV-11.

40

VLP del HPV-16_{Tr}

Para su utilización en los estudios de desmontaje y reensamblaje de VLP durante la purificación, se expresaron proteínas L1 de PHV-16_{Tr} (compuestas de una forma mutada de la proteína L1 del HPV-16 de la que se habían eliminado los 34 aminoácidos C-terminales) en células High Five[®] como se describió anteriormente. La pasta celular se volvió a poner en suspensión en tampón de extracción (Tris 10 mM, Triton X-100 al 1,0%, pH 6,0), se mezcló en agitación y se centrifugó levemente a 1.000 × g. El sedimento que contenía las VLP del HPV-16_{Tr} se volvió a poner en suspensión en Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, tampón de pH 8,0, se agitó brevemente y se centrifugó a 3.000 × g durante 30 min. Se recogió el sobrenadante, se filtró a través de filtros con jeringuilla de acetato de celulosa de 0,45 µ y a continuación se incubó en presencia o ausencia de βME al 4% durante más de 2 horas a 4°C antes de utilizarlo en pruebas de purificación en columna. El sobrenadante clarificado y filtrado (+/-βME) se aplicó a diferentes resinas de intercambio iónico a valores de baja conductividad (5 a 15 miliohmios), se lavó con varios volúmenes de columna de tampón de equilibrio y se eluyó con un gradiente creciente de NaCl. Para probar la utilidad de HIC para eliminar el ADN residual y los contaminantes proteicos, se agruparon las fracciones que contienen el pico de la proteína L1 eluido del IEC, se ajustaron a 0,7 M en sulfato amónico y se aplicaron a una columna HIC equilibrada en el mismo tampón. La columna se lavó con varios volúmenes de columna de tampón equilibrado y a continuación se eluyó la proteína L1 de la columna HIC a una concentración de sulfato amónico inferior. Los productos finales de los procesos de purificación (+/-βME) se dializaron extensamente frente a PBS (NaCl 0,5 M) y se compararon desde el punto de vista de la pureza, rendimiento y ADN residual. El aspecto de las VLP se caracterizó por microscopía electrónica y análisis de gradiente lineal de sacarosa (véase a continuación).

60

Centrifugado en gradiente de sacarosa

65 En estos experimentos se utilizaron tres tipos de gradientes de sacarosa. En primer lugar, se utilizó el centrifugado en gradientes de sacarosa al 30% para identificar las condiciones que favorecían el desmontaje de las VLP en componentes solubles más pequeños. 100 a 200 µl de mezclas de reacción que contenían agentes de destrucción más o menos potencial de las VLP (50 a 100 µg de proteína total) se estratificaron en la parte superior de tubos de centrifugadora de

5 ml rellenos con 4,8 ml de sacarosa al 30% (p/p en PBS-NaCl 0,5 M) y se centrifugaron a $197.000 \times g$ durante 2 horas a 40°C en una máquina rotatoria con cubeta oscilante. Se tomó una alícuota de $50 \mu\text{l}$ de la parte superior del tubo y se mezcló con $2\times$ de tampón de preparación de la muestra de Laemmli (Laemmli, U.K., *Nature*, 227:680-685 (1970)). El resto del gradiente de sacarosa al 30% se eliminó con la pipeta, y el “sedimento” (normalmente no era visible) se volvió a poner en suspensión en $100 \mu\text{l}$ de $1\times$ tampón de preparación de la muestra de Laemmli. La presencia de la proteína L1 del HPV-11 en la superficie o el fondo del gradiente de sacarosa al 30% se determinó a continuación por SDS/PAGE, y la cantidad relativa de L1 se cuantificó por análisis de los geles cuantificados. En segundo lugar, se determinó el estado de las VLP desmontadas por centrifugación de velocidad por zonas en todos los gradientes de sacarosa lineal del 5 al 20%. Las VLP desmontadas (100 a $200 \mu\text{g}$ de proteína total en $400 \mu\text{l}$) se estratificaron sobre $11,6 \text{ ml}$ de gradientes preformados compuestos de sacarosa del 5 al 20% (p/v en PBS-NaCl 0,5 M) y se centrifugó a $111.000 \times g$ durante 24 horas a 4°C en una máquina rotatoria con cubeta oscilante. Se recogieron las fracciones ($0,5 \text{ ml}$) a través del gradiente, y se volvió a poner en suspensión el “sedimento” (normalmente no fue visible) en $0,5 \text{ ml}$ de PBS por homogenización Dounce. La posición de la proteína L1 del HPV-11 a través del gradiente se determinó por inmunotransferencia. Se calibraron los gradientes utilizando proteínas patrón con coeficientes de sedimentación establecidos (β -galactosidasa de *E. coli*, 19 S; catalasa de hígado bovino, 11,3 S; albúmina de suero bovino, 4,3 S) y se determinó por refractometría el porcentaje de sacarosa en las fracciones.

En tercer lugar, se determinó el estado de las VLP iniciales, desmontadas y reensambladas por centrifugación de velocidad por zonas en todos los gradientes lineales de sacarosa del 10 al 65%. La proteína de L1 de HPV-11 (100 a $200 \mu\text{g}$ de proteína total en $400 \mu\text{l}$) en varios estados de ensamblaje se estratificaron sobre $11,6 \text{ ml}$ de gradientes preformados compuestos de sacarosa del 10 al 65% (p/v en PBS-NaCl 0,5 M) y se centrifugó a $188.000 \times g$ durante 2,5 horas a 40°C en una máquina rotatoria con cubeta oscilante. Se recogieron los gradientes (en fracciones de $1,0 \text{ ml}$), se analizaron y se calibraron como anteriormente, con parvovirus B19 (70 S) y las VLP L1 de HPV-18 (160 S) se utilizaron como patrones de calibración adicionales.

Electroforesis en gel

SDS/PAGE

Se realizó la SDS/PAGE en gran parte según el método de Laemmli (Laemmli, U.K., *Nature*, 227:680-685 (1970)). Se mezclaron las muestras con tampón de preparación de la muestra, se hirvieron durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente en una centrifugadora y se cargaron en minigeles al 7,5% (Fig. 1) o 10% (Figs. 2 a 4) con un gel corriente al 4%. Los geles se introdujeron durante aproximadamente 1 hora a una corriente constante de 20 mA a temperatura ambiente y la proteína se observó por tinción con azul brillante R250 de Coomassie.

Inmunotransferencia

Se prepararon electrotransferencias de L1 de HPV-11 procedentes de los geles de SDS/PAGE en gran parte según el método de Towbin *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354 (1979)). Se bloquearon las transferencias con proteína de leche desnatada al 1% en PBS durante la noche a 4°C . Las transferencias se sondaron con AU1 (Berkley Antibody Co.), monoclonal de ratón dirigido contra un epítipo lineal en las proteínas L1 de papilomavirus (25) durante 90 minutos, se lavaron con PBS, Triton X-100 al 0,1% y a continuación se volvieron a bloquear durante 30 minutos. Las transferencias se incubaron a continuación con IgG anti-ratón de cabra marcada con HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc.) durante 40 minutos y se lavaron como anteriormente. Las transferencias se revelaron a continuación con reactivo ECL de transferencia Western (Amersham) y se expusieron a película de rayos X.

Análisis de geles

Se determinó la M_r de L1 monomérica y oligomérica a partir de sus valores R_f en SDS/PAGE al 7,5%, en comparación con las proteínas patrón (véase, Jackowski *et al.*, en T. E. Creighton (ed.), *Protein structure: a practical approach*, IRL Press, Nueva York, pág. 1-21 (1989)). Cuando se indicaba, se cuantificaron los geles en un densitómetro del lecho plano Scanjet Plus de Hewlett Packard, y se determinó la intensidad relativa de las bandas utilizando un programa informático Scan Analysis (versión 2.2; Specom Research).

Microscopia electrónica

Las muestras de proteína se dejaron sedimentar en rejillas de cobre recubiertas de formvar y carbono (Electron Microscopy Sciences), se transfirieron en seco y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2% recién filtrado (pH 6,8). Se examinaron las rejillas en un microscopio de transmisión electrónica modelo 1005 JEOL a un voltaje de aceleración de 100 KV y se fotografiaron a ampliaciones nominales de 15 a $25.000\times$.

Ensayo inmunosorbente con enzima ligada (ELISA)

Las VLP L1 del HPV-11 ($0,5$ a $1,0 \text{ mg/ml}$ de L1) en PBS-NaCl $0,3 \text{ M}$ se almacenaron sin tratamiento a 4°C o se incubaron durante la noche a 4°C después de la adición de βME (hasta una concentración final del 5%) o tampón de carbonato $2,0 \text{ M}$, pH 9,6 (hasta una concentración final de carbonato 200 mM). Una fracción de las muestras tratadas se dializó a continuación frente a $4\times$ IL PBS-NaCl $0,5 \text{ M}$ a 4°C durante $\geq 24 \text{ h}$. Se diluyeron todas las muestras hasta una concentración de $0,8 \mu\text{g}$ de L1/ml y se distribuyeron en los pocillos de placas de microvaloración (80 ng de L1

por pocillo). Las VLP no tratadas y el material dializado se diluyeron en PBS. La muestra tratada con β ME sin diálisis posterior se diluyó en PBS que contiene β ME al 5%, y la muestra no dializada incubada en carbonato 200 mM se diluyó en carbonato 200 mM, pH 9,6. Después de la incubación a 37°C durante 1 h las placas se lavaron con PBS, Tween-20 al 0,1% (PBS-Tw) y se bloquearon con proteína de leche desnatada al 5% en PBS. Los anticuerpos monoclonales (AU1 o H11.F1 y H11.A3 purificados en ascitis se adquirieron en la Pennsylvania State University (Christensen *et al.*, *J. Virol.*, 64:5678-5681 (1990)), se diluyeron en leche desnatada al 1% en PBS y se añadieron a los pocillos. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas con PBS-TW y se añadió IgG antirratón de cabra marcada con HRP. Después de 1 h a temperatura ambiente, se lavaron las placas como anteriormente y se revelaron con sustrato HRP (Kirkegaard y Perry Laboratories). Se realizaron mediciones de densidad óptica a 405 nm en el punto final durante 15 min. Las medias de los pocillos duplicados se calcularon como valores de densidad óptica final.

Ensayo de neutralización de HPV-11

Se generaron en ratones BALB/c (grupos de 5) antisueros contra las VLP de HPV-11 originales purificadas y las VLP de HPV-11 que estaban desmontadas por exposición prolongada al agente reductor sulfhidrido y a continuación se reensamblaron en el momento de la eliminación del agente reductor por diálisis. Se inyectó s.c. a los ratones 1 μ g de las VLP adsorbidas a razón de 1 μ g/ml de adyuvante alhidrogel la semana 0, 4 y 9, con extracciones de sangre terminales realizadas la semana 13. Para determinar si los antisueros aparecidos en los ratones eran susceptibles de neutralizar el virus HPV-11, se determinó la capacidad de los antisueros para bloquear la expresión de un ARNm cortado y empalmado del HPV-11 específico en una lineal celular humana (HaCaT).

Una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados, HaCaT (Boukamp *et al.*, *J. Cell Biol.*, 106:761-771 (1988)) fue proporcionada por el Dr. Norbert Fusenig. Las células se cultivaron hasta confluencia en 154/HKGS (Cascade Biologics, Inc.) enriquecido con penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 μ g/ml) en placas de 24 pocillos. El virus madre HPV-11^{Hershey}, se adquirió al Dr. John Kreider (Kreider *et al.*, *J. Virol.*, 61:590-593 (1987)), se sometió a ultrasonidos durante 25 s en hielo, se diluyó en medio 154/HKGS, y se incubó durante una hora a 37°C. Se aspiró el medio procedente de las células HaCaT y se añadieron 0,5 ml por pocillo de virus diluido. Como referencia, un pocillo de células en cada placa recibió 0,5 ml de medio sin virus. Para la neutralización mediada por anticuerpos, se diluyeron los antisueros en 154/HKGS y se incubaron con una cantidad fija del virus madre HPV-11 en un volumen final de 0,5 ml por hora a 37°C antes de la adición a las células HaCaT. Se añadió medio reciente a cada pocillo de células cuatro días después de la infección y el día seis las células se recogieron y se preparó el ARN celular total utilizando reactivo Tri (Molecular Research Center, Inc.). Se volvieron a poner en suspensión los sedimentos de ARN finales en 20 μ l de agua tratada con DEPC y se cuantificaron por espectrofotometría.

Se determinó la capacidad de los antisueros para bloquear la expresión del ARNm cortado y empalmado específico para HPV-11 por (RT)-PCR con transcriptasa inversa. Se realizaron reacciones RT utilizando un kit de ADNc First Strand (Boehringer Mannheim) con 2 μ g de ARN completo como plantilla y oligo dT como cebador. Se necesitó PCR anidada para detectar ADNc E1^{E4} del HPV-11. La primera ronda de ampliación se realizó con 25% del ADNc procedente de cada reacción RT y 5'-TACAAGACCTTTGCTGGGCACA-3' (situada en las bases 765 A 787 en la secuencia genómica del HPV-11) como cebador externo transcrito y 5'-AAAGGCAGGAAAATAGCACAC-3' (situada en las bases 4088 a 4110 en la secuencia genómica del HPV-11) como cebador externo complementario durante 30 ciclos de PCR. Se utilizó el diez por ciento de la primera ronda de PCR para las reacciones anidadas con 5'-ATATTGTGTGTCATCTGCG-3' (situada en las bases 792 a 812 como cebador transcrito anidado y 5'-CAGCAATTTGTACAGGCACTAC-3' (situada en las bases 3877 a 3898 en la secuencia genómica del HPV-11) como cebador complementario anidado durante 30 ciclos de PCR. La primera ronda y las reacciones de PCR anidadas se montaron con perlas Hot Wax (1,5 mM) y tampón de pH 9,5 (Invitrogen) con las dNTP 200 μ M, 125 ng de cada cebador transcrito y complementario y 2,5 unidades de Taq polimerasa (Perkin-Elmer) en un volumen final de 50 μ l. El perfil de temperatura tanto para la primera ronda como para PCR anidada fue de 80°C/5 min, 95°C/30 s, 72°C/30 s, con una ampliación final a 72°C durante 10 min.

Como referencia para demostrar que el análisis pudo detectar el ARNm extraído de las células HaCaT, se utilizaron todas las muestras de ADNc en las reacciones de PCR independientes con cebadores específicos para el ARNm con β -actina celular cortado y empalmado como se describió y se amplió como anteriormente (Smith *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 105:1-7) (1995)).

Todos los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y se observaron mediante fluorescencia con bromuro de etidio.

Ejemplo 1

Desmontaje cuantitativo de las VLP del HPV-11

Se prepararon cantidades relativamente grandes de las VLP L1 del HPV-11 como material de partida para el estudio del desmontaje y reensamblaje de VLP. Se aislaron las VLP L1 de HPV-11 de las células High Five[®] infectadas por baculovirus recombinante por centrifugación en CsCl y gradiente de sacarosa. La pureza calculada de estas preparaciones de L1, basada en análisis densitométrico de SDS/PAGE, osciló entre el 70 y el 90% (véase la Fig. 1, banda 2). Además, en los gradientes lineales de sacarosa la mayor parte de la proteína migró como era de esperar para una

mezcla de VLP aisladas y agrupadas (Fig. 4a), y al microscopio electrónico se hizo patente una mezcla de partículas intermedias y de tamaño natural (50 a 55 nm) (Fig. 5a).

Las interacciones covalentes y no covalentes que estabilizan las VLP de L1 montadas no son completamente conocidas, pero los trabajos iniciales sobre las VLP de papilomavirus y los viriones de poliomavirus citados y las VLP sugirieron la importancia de la fuerza iónica, de los cationes divalentes (Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977); Salunke *et al.*, *Biophys. J.*, 56:887-900 (1987) y de los enlaces disulfuro (Sapp *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 76:2407-2512 (1995); Volpers *et al.*, *Virology*, 200:504-512 (1994). En especial, Sapp y colaboradores han demostrado por inmunotransferencia que ~50 por ciento de la proteína L1 de las VLP de HPV-33 estaba unida por disulfuro en una gama de oligómeros mayores con una M_r aparente coherente con los trímeros de L1, y que las condiciones reductoras suaves destruyen parcialmente las VLP del HPV-33 a nivel de los capsómeros (Sapp *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 76:2407-2412 (1995); Volpers *et al.*, *Virol.*, 200:504-512 (1994)). En los estudios de los solicitantes, en ausencia de agentes reductores solamente una fracción de la proteína L1 de HPV-11 migró en SDS/PAGE con una M_r aparente de 55.000 Da (Fig. 1, banda 1). Aproximadamente el 40% (el porcentaje variaba entre las diferentes preparaciones de VLP) de la proteína L1 de las VLP de HPV-11 estaba unida por disulfuro en los oligómeros mayores (Fig. 1, banda 1), con valores de M_r previstos de aproximadamente 144.000 Da (posiblemente el trímero L1) y 210.000 Da (posiblemente el tetrámero de L1). Los oligómeros de L1 no migraron como banda única y parecían que eran de tamaño heterogéneo. Los oligómeros de ~200.000 Da fueron observados también por Sapp y colaboradores (Sapp *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 76:2407-2412 (1995); Volpers *et al.*, *Virol.*, 200:504-512 (1994)), como parte de una banda amplia de peso molecular mayor. Estos resultados indican que una fracción de las proteínas L1 en las VLP de HPV-11 están unidas al disulfuro en los oligómeros superiores. Para estudiar la función de los enlaces disulfuro y de otras interacciones en la estabilidad de VLP, se desarrolló un análisis de identificación rápido para el desmontaje de VLP. Las VLP L1 de HPV-11 purificado, tanto antes como después de varios tratamientos, se estratificaron sobre gradientes de sacarosa al 30%, se centrifugaron y la distribución de la proteína L1 en la parte superior y el fondo del gradiente del 30% fue observada por SDS/PAGE. Era de esperar que las VLP intactas sedimentaran en todo el gradiente de sacarosa al 30%; los capsómeros no aglomerados y el monómero L1 eran de esperar que se quedasen en la parte superior del gradiente. Un ejemplo de este análisis se presenta en la Fig. 2. Para cuantificar la disposición relativa de la proteína L1, se cuantificaron los geles, se determinó la intensidad total de las bandas L1 en la superficie y el fondo del gradiente, y a continuación se calculó el porcentaje de la intensidad de la coloración de L1 en una de las dos posiciones. Los resultados de un número de dichas determinaciones se tabulan en las Tablas 1 y 2. Como se demostró en la Fig. 2, el material de partida de VLP purificado sedimentó en todo el gradiente de sacarosa al 30%, como estaba previsto, sin L1 visible en la superficie. Sin embargo, en la incubación con una gran concentración del agente reductor β -mercaptoetanol (β ME), se encontró proteína L1 mayormente en la superficie del gradiente de sacarosa al 30%, lo que indica que el agente reductor había desmontado las VLP del HPV-11 en componentes no aglomerados más pequeños. De manera interesante, el máximo desmontaje de las VLP necesitó típicamente la exposición a una concentración muy alta de agente reductor (en este caso β ME al 5% o 713 mM) para una duración relativamente prolongada (~16 horas a 4°C). Concentraciones inferiores de agente reductor o duraciones inferiores de la reducción no fueron tan eficaces de fuente fidedigna en el desmontaje de VLP. La adición de una baja concentración de agente quelante no aumentó el desmontaje (Fig. 2 y Tabla 1).

Además de los reductores, se descubrió que otras variables importantes para el desmontaje cuantitativo de las VLP eran la fuerza iónica durante la reacción de desmontaje y la solubilidad del material de partida de VLP. Como se observó inicialmente para los viriones de poliomavirus, las condiciones de fuerza iónica inferior desestabilizan las VLP (Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977)), aunque (Sapp *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 76:2407-2412 (1996)), publicaron que la generación de los capsómeros de HPV-33 de las VLP era insensible a la concentración salina entre NaCl 0,15 M y 0,6 M. Para las VLP de HPV-11, el desmontaje máximo (~90%) de las VLP expuesto a β ME al 5% durante 16 horas se observó a fuerza iónica "fisiológica" (es decir, NaCl 0,15 M), pero se volvieron como corresponde menos eficaces a medida que aumentaba la fuerza iónica (Tabla 1). El efecto estabilizante del aumento de fuerza iónica pudo superarse en parte incubando las VLP con agentes reductores durante periodos más prolongados o a temperaturas elevadas. Sin embargo, mientras que al incubar las VLP con β ME al 5% durante 120 horas a 4°C, o durante 24 horas a 24°C aumentaba el alcance del desmontaje entre 60 y 70% a NaCl 0,5 M, el desmontaje estaba todavía lejos de ser completo (datos no mostrados). Además, para el desmontaje cuantitativo, el grado de acumulación del material de partida de VLP era también importante. En los experimentos publicados aquí, las soluciones de VLP se dializaron en diferentes tampones de fuerza iónica y se almacenaron a 4°C hasta su utilización en pruebas de desmontaje. Tras varios días, particularmente a NaCl 0,15 M, las soluciones fueron ligeramente turbias, lo que indica algún grado de aglomeración (si bien se observó poco o ningún precipitado). El tratamiento de las soluciones de VLP turbias con agentes reductores no proporcionó el mismo grado de desmontaje que el que se observó con una solución inicial de VLP soluble, lo que indica que las VLP aglomeradas eran resistentes al desmontaje. Sin embargo, en la eliminación del material aglomerado (que oscila entre el 10 y el 50% del total de las VLP dependiendo de la antigüedad de la preparación) por filtración, las VLP solubles restantes de nuevo podrían desmontarse en la misma medida que el material de partida inicial de la VLP soluble.

Resulta interesante, incluso a grandes concentraciones de quelantes, que la quelación de los cationes no influya de manera significativa en el desmontaje de VLP. La diálisis de las VLP en tampones de EDTA o EGTA 200 mM (PBS-NaCl 0,3 M, pH 7,4) no condujo a ningún desmontaje apreciable y la adición de ditiotreitól (DTT) 10 mM a los tampones de diálisis tuvo poco efecto (Tabla 2). La incapacidad de las elevadas concentraciones de quelantes para desmontar las VLP se confirmó por análisis de microscopía electrónica, aunque EDTA (pero no EGTA) parecía que hinchaba ligeramente las VLP (datos no mostrados). Cualquiera de estas concentraciones de quelantes son insuficien-

tes para extraer el enlace de forma rigurosa, los iones estructuralmente importantes, o los cationes no son esenciales para mantener la integridad estructural de VLP. Por el contrario, la adición de una alícuota concentrada de tampón de NaHCO₃ (pH 9,6) a una solución de las VLP, hasta una concentración final de carbonato 200 mM (en PBS-NaCl 0,3 M), produjo alteración significativa de las VLP (Tabla 2). La adición de DTT (hasta una concentración final de 10 mM) no aumentó más la alteración producida por el carbonato. La incubación de las VLP con carbonato 200 mM/DTT 10 mM se utiliza normalmente para desnaturalizar los viriones de HPV o las VLP en el análisis ELISA (Favre *et al.*, *J. Virol.*, 15:1239-1237 (1975); Christensen *et al.*, *J. Virol.*, 64:3151-3156 (1990); Christensen *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 75:2271-2276 (1994)). El efecto del carbonato parece ser específico del tampón, y no meramente una función del pH, ya que la incubación de las VLP de HPV-11 con tampón de glicina a pH 9,6 (concentración final 200 mM) produjo muy poca alteración de VLP, medida por el análisis del gradiente de sacarosa al 30% (Tabla 2). Asimismo, (Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977)), observaron que el tampón de carbonato a pH alcalino, pero no a pH alcalino solo, disociaba los viriones del poliomavirus. Sin embargo, el efecto específico del carbonato a pH 9,6 no parece ser debido a la capacidad quelante potencial del carbonato, como fue sugerido por (Brady *et al.*, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977)), ya que EDTA 200 mM a pH 9,6 (DTT+/-10 mM) era completamente ineficaz en el desmontaje de VLP (datos no mostrados).

Ejemplo 2

Caracterización de las VLP del HPV-11 desmontadas

Tras la exposición de larga duración a altas concentraciones de agente reductor, las VLP purificadas parece que se alteran a nivel de los capsómeros. Como se presenta en la Fig. 3a, las VLP desmontadas generadas por incubación con β ME al 5% durante 16 horas a 4°C migraron en gradientes lineales de sacarosa del 5 al 20% con un coeficiente medio de sedimentación de $11,3 \pm 1,5$ S (n=5), determinados por comparación con los patrones de sedimentación. Se observaron de forma ocasional especies mayores, con un coeficiente de sedimentación calculado entre 16 y 18 S (quizás capsómeros diméricos), e incluso materiales sedimentados. Sin embargo, menos del 10% de la L1 se detectó en la parte superior del gradiente (posición esperada para el monómero L1) o en el sedimento (posición esperada para las VLP intactas o los capsómeros aglomerados), lo que sugiere que el material de partida de VLP purificado se desmontó en gran parte a nivel de los capsómeros aislados durante la reducción prolongada. Esta conclusión está apoyada por el análisis microscópico electrónico de las VLP después de incubación prolongada con β ME al 5%, que representa un campo de capsómeros homogéneos (Fig. 5b) por término medio de $9,7 \pm 1,2$ nm (n=15) de diámetro, ocasionalmente con unas estructuras aglomeradas visibles un poco más grandes (la L1 monomérica no se detectó con esta técnica). El diámetro estimado del capsómero es ligeramente más pequeño que el observado al microscopio crioelectrónico (11 a 12 nm) (Baker *et al.*, *Biophys. J.*, 60:1445-1456 (1991); Hagensee *et al.*, *J. Virol.*, 68:4503-4505, (1994); Belnap *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 259 :249-263 (1996)), quizás debido a la contracción durante la preparación de la rejilla al microscopio electrónico. Los datos demostrados en las Figs. 3a y 5b indican que la exposición prolongada a altas concentraciones de reductores desmonta cuantitativamente las VLP solubles y purificadas en una población homogénea de capsómeros.

Los capsómeros generados a partir de las VLP de HPV-11 durante la exposición de larga duración a altas concentraciones de agente reductor contienen epítomos estructurales observados en las VLP intactas. Se ha descrito que un panel de anticuerpos monoclonales específicos de HPV-11 reacciona con las VLP L1 de HPV-11 intactas pero no con las L1 “desnaturalizadas”. Estos monoclonales incluyen H11.F1, que se ha demostrado que reconoce un epítomo neutralizante dominante en los viriones de HPV-11 y H11.A3, un anticuerpo dependiente de la estructura no neutralizante distinta (Christensen y Kreider, *J. Virol.*, 64:3151-3156 (1990); Christensen *et al.*, *J. Virol.*, 64:5678-5681 (1990)). Como estaba previsto, H11.F1 y H11.A3 reaccionaron intensamente con el material de partida de VLP de HPV-11 purificado cuando se analizó por ELISA (Fig. 6a). Sin embargo, estos anticuerpos también reaccionaron con los capsómeros generados a partir del material de partida de VLP por exposición al agente reductor (Fig. 6b). Por lo tanto, los capsómeros poseen por lo menos algunos de los epítomos dependientes de la estructura observados en la superficie de las VLP intactas y en los viriones auténticos, de acuerdo con los estudios realizados por Li *et al.*, (*J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)) en los capsómeros de HPV-11 expresados en *E. coli*. Estos resultados demuestran además que los anticuerpos monoclonales H11.F1 y H11.A3, aunque requieren una configuración “natural” para el enlace, no dependen de VLP como se ha descrito anteriormente (Ludmerer *et al.*, *J. Virol.*, 71:3834-3839 (1997)).

En cambio, los anticuerpos monoclonales H11.F1 y H11.A3 no pueden reconocer las VLP de HPV-11 disociadas por tratamiento con tampón de carbonato a pH 9,6 (datos no mostrados; Christensen *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 75:2271-2275 (1994)). El tratamiento con carbonato no condujo a una solución homogénea de capsómeros, pero en su lugar apareció como una mezcla indistinta de pequeños objetos, parcialmente acumulados, cuando se examinaron al microscopio electrónico (datos no mostrados). Esta observación se confirmó parcialmente por análisis de las VLP tratadas con carbonato en gradientes lineales de sacarosa del 5 al 20%, en los que la proteína L1 migró en gran parte a ~4 S, aunque se observó una pequeña población entre 9 y 11 S (Fig. 3b), de acuerdo con los efectos del tampón de carbonato (a pH 10,6, con DTT 10 mM) en los viriones de BPV (Favre *et al.*, *J. Virol.*, 15:1239-1247 (1975)). Por último, aunque el tratamiento con tampón de glicina a pH 9,6 no disoció las VLP en partículas individuales más pequeñas (Tabla 2), ejerció algún efecto. Las VLP tratadas con glicina a pH 9,6 aparecían al microscopio electrónico como una mezcla poco definida de VLP intactas, y parcialmente alteradas y aglomeradas (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Reensamblaje cuantitativo de las VLP de HPV-11

5 El reensamblaje de VLP de capsómeros de HPV-11 tuvo lugar durante la eliminación del agente reductor, bien por diálisis o por cromatografía en columna. Partiendo de una preparación homogénea de capsómeros solubles, la diálisis prolongada en ausencia de agentes reductores proporcionó regularmente una población definida de las VLP reensambladas (Figs. 4c y 5c, d). Las VLP reensambladas conservaban los epítomos estructurales reconocidos por los anticuerpos monoclonales H11.F1 y H11.A3 (Fig. 6c).

10 Para el reensamblaje, se dializaron capsómeros (1 a 5 ml a 0,5 a 1,0 mg/ml de proteína total) frente a 4 × 1 l de PBS-NaCl 0,5 M a 4°C durante ≥24 h; la concentración salina elevada se diseñó para estabilizar las VLP. Mientras que la adición de agentes quelantes no aumentó de manera apreciable la capacidad de los agentes reductores para desmontar las VLP (Tabla 1), la presencia de EDTA 2 mM interfirió de forma moderada con el desmontaje, proporcionando las VLP que migraron en un gradiente lineal de sacarosa del 10 al 65% como una población apenas discreta de partículas de 150 S pero aparecían aplanadas y parcialmente abiertas al microscopio electrónico (datos no mostrados). Por el contrario, la adición de Ca²⁺ 2 mM durante la reacción de reensamblaje dio lugar a que las VLP se adhiriesen unas a otras, como se presenta en el análisis de gradiente lineal de sacarosa del 10 al 65%, en el que las VLP reensambladas en presencia de calcio migraron completamente al sedimento. Sin embargo, la presencia de Ca²⁺ no pareció de otro modo influir en la morfología básica de VLP cuando se examinaron al microscopio electrónico (datos no mostrados). Por último, la diálisis de las VLP tratadas con carbonato en PBS-NaCl 0,5 M no condujo al reensamblaje de las VLP. En su lugar, la proteína L1 se mantuvo bien en forma de componentes pequeños y solubles o precipitado amorfo y aglomerado, como se demostró tanto al microscopio electrónico como por análisis del gradiente lineal de sacarosa del 10 al 65% (datos no mostrados). La diálisis de las VLP tratadas con carbonato para restablecer la reactividad con anticuerpos monoclonales de estructura específica H11.F1 y H11.A3 (Fig. 6d).

Caracterización de las VLP de HPV-11 reensambladas

30 Tras la eliminación del agente reductor, los capsómeros se reensamblaron cuantitativamente en las VLP. Sorprendentemente, las VLP reensambladas eran muchos más homogéneas en tamaño de partícula que el material de partida de VLP purificado en cesio y gradiente de sacarosa. Cuando se compararon las tres etapas de la reacción de desmontaje, reensamblaje con los gradientes lineales de sacarosa del 10 al 65%, el material de partida de VLP purificado se distribuyó en todo el gradiente, migrando muchas partículas a la posición esperada por las VLP intactas (150 a 160 S), pero con la mayoría de la proteína más abajo del gradiente y en el sedimento (Fig. 4a). Asimismo, cuando se examinó al microscopio electrónico (Fig. 5a), se observó que el material de partida de VLP era una mezcla de partículas de diferentes tamaños, incluyendo tamaño natural, VLP de diámetro entre 50 y 55 nm. Es posible que alguna alteración de las VLP se produjera durante la extracción y purificación, ya que el análisis del gradiente lineal de sacarosa de las etapas iniciales del proceso de purificación indicaba una distribución más homogénea de los tamaños de partícula (datos no mostrados).

40 Durante la exposición de larga duración a concentraciones elevadas de agentes reductores, se desmontaron las VLP en capsómeros, como se describió anteriormente. En comparación con el material de partida de VLP, los capsómeros migraron a la parte superior de los gradientes lineales de sacarosa del 10 al 65% (con poca o ninguna L1 detectada en el sedimento; Fig. 4b) y en el microscopio electrónico apareció como un campo inalterado de capsómeros (Fig. 5b).

45 El reensamblaje de los capsómeros proporcionó una población homogénea de VLP esféricas de tamaño natural. Las VLP reensambladas oscilaron en la mitad de los gradientes lineales de sacarosa del 10 al 65%, con un coeficiente de sedimentación previsto de 150,4±4,6 S (n=7), con mucha menos L1 detectada bien en el sedimento o en el fondo del gradiente que la observada con el material de partida de VLP purificado (Fig. 4c). La homogeneidad de las VLP reensambladas fue incluso más sorprendente cuando se examinaron al microscopio electrónico, como se demuestra en la Fig. 5c, d. Generalmente se detectaron partículas en el intervalo de las VLP de tamaño natural, promedio de 56,5±7,0 nm (n=15), con muy pocas VLP parcialmente ensambladas o complejos más pequeños visibles. Los rendimientos del proceso de reensamblaje eran también impresionantes (por término medio 83% desde el punto de vista de la proteína L1 total del material de partida a las VLP reensambladas en condiciones óptimas de desmontaje), ya que esencialmente todos los capsómeros parecían volver a formar VLP solubles, filtrables y de tamaño natural.

Ejemplo 4

Comparación de la capacidad de las VLP de HPV-11 purificadas iniciales y de las VLP de HPV-11 reensambladas para generar anticuerpos neutralizantes de virus

60 Para que las VLP reensambladas funcionen con éxito como vacunas experimentales, es esencial que conserven la capacidad para producir anticuerpos neutralizantes de virus cuando se inyectan en animales experimentales. Para demostrar esto, se generaron en ratones BALB/c antiseros policlonales tanto contra las VLP de HPV-11 iniciales, purificadas como contra las VLP de HPV-11 desmontadas/ensambladas, como se describe en el apartado Métodos. Cada uno de los antiseros fue igualmente reactivo contra el inmunógeno correspondiente cuando se analizó en un formato ELISA (datos no mostrados). De manera más importante, cuando se analizaron en el análisis de neutralización RT-PCR que implica viriones de HPV-11 infecciosos (Smith *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 105:1-7 (1995)), los antiseros

policlonales específicos de VLP de HPV-11 postinmunes reensamblados presentaron un título de neutralización entre 10^{-5} y 10^{-6} , igual al obtenido con los antisueros generados contra las VLP de HPV-11 iniciales, purificadas (Fig. 7). Esto demuestra que las VLP del HPV-11 reensambladas conservan en gran medida el dominio inmunógeno, antigénico neutralizante del cápsido de los viriones HPV-11, y poseen el potencial para servir como vacunas para la prevención de la enfermedad genital por HPV. Además, dado que las VLP reensambladas representan una preparación homogénea de las VLP de tamaño natural (es decir, el tamaño de virus infeccioso), es posible que las VLP inmunógenas sean más potentes que las VLP iniciales purificadas, que son de tamaño heterogéneo, una posibilidad que se está ensayando actualmente es la dosificación de ratones con cantidades decrecientes de las VLP iniciales y reensambladas.

5 Ejemplo 5

Aplicación del desmontaje y reensamblaje de VLP durante la purificación de las VLP del HPV

Como se expuso anteriormente, los métodos convencionales de purificación de proteínas no están optimizados para su utilización con el tamaño de las VLP de los complejos proteicos (20.000.000 Da, partículas de 55 nm de diámetro). En particular, el tamaño total de las VLP reduce drásticamente la capacidad y utilidad de la mayoría de las resinas cromatográficas, ya que mucha de la reactividad química en la resina es estéricamente inaccesible a la VLP. Sin embargo, esta dificultad puede impedirse en potencia desmontando las VLP en bruto extraídas de las células, purificando las VLP desmontadas utilizando métodos normalizados y volviendo a montar las VLP en la etapa deseada de pureza. Una segunda preocupación en la purificación de VLP es la contaminación con el ADN residual. En el trabajo inicial realizado con las VLP del HPV-11 purificado, persiste un determinado nivel de ADN de fondo que no se elimina por tratamiento con ADNasa, lo que sugiere que el ADN está encapsulado dentro de las VLP o asociado muy íntimamente con ellas. El desmontaje de las VLP debería permitir el aumento de eliminación del ADN contaminado, una consideración importante para cualquier compuesto biológico deseado para su utilización clínica.

Para probar este potencial, se extrajeron VLP del HPV-16_{Tr} de las células de insecto infectadas con baculovirus, y se purificaron por IEC convencional y cromatografía de HIC como se describe en el apartado Métodos, en ausencia de agente reductor de sulfhidrilo (VLP intactas) o en presencia de β ME al 4% (VLP desmontadas). En este último caso, las VLP extraídas se incubaron con β ME al 4% durante más de 2 h a 4°C antes de la cromatografía en columnas de IEC y de HIC, que se equilibraron también en β ME. Los productos purificados finales de ambos procedimientos de purificación (es decir, en presencia o ausencia de agente reductor sulfhidrilo) se dializaron frente a 4×1 L de PBS (NaCl 0,5 M) y se determinó la pureza, rendimiento y concentraciones de ADN residual. Como se muestra en la Tabla 3, una preparación representativa purificada en ausencia de β ME produjo las VLP de HPV-16_{Tr} que eran sólo aproximadamente del 60% de pureza (desde el punto de vista de la contaminación de la proteína) y contenían concentraciones de ADN superiores a las deseadas para la utilización humana. Por el contrario, tres preparaciones de VLP purificadas en estado desmontado se caracterizaron por rendimientos mayores, pureza de la proteína significativamente mayor y ADN residual sustancialmente reducido. La pureza mayor de la proteína de las VLP purificadas en estado desmontado es fácilmente visible cuando se analizan por SDS/PAGE, como se muestra en la Fig. 8. El tamaño y la homogeneidad de las VLP de HPV-16_{Tr} reensambladas después de la purificación ha sido más heterogénea que la observada para el reensamblaje de las VLP de HPV-11 purificadas, pero por término medio han sido tan homogéneas como las VLP de HPV-16_{Tr} purificadas sin desmontaje, y en algunos casos han formado VLP de tamaño natural uniformemente homogéneas, algo que nunca se ha observado con las VLP de HPV-16_{Tr} sin desmontaje (datos no mostrados).

Existen interesantes diferencias en los efectos del tratamiento prolongado con agentes reductores sulfhidrilo entre las VLP de HPV-16_{Tr} y HPV-11 purificadas. En primer lugar, las VLP de HPV-16_{Tr} parecen desmontarse de manera cuantitativa a concentraciones inferiores de agente reductor y/o a periodos más cortos de exposición (datos no mostrados). No está claro si esto refleja una diferencia genuina entre las VLP de HPV-16 y de HPV-11, o si es debido al truncamiento C-terminal de la proteína L1 del HPV-16_{Tr}, ya que en las pruebas preliminares los solicitantes han observado que los accesorios proteolíticos del terminal C de la proteína L1 del HPV-11 también aceleran la destrucción de las VLP en presencia del agente reductor sulfhidrilo. Una característica más interesante consiste en que el tratamiento de las VLP de HPV-16_{Tr} purificadas con el agente reductor sulfhidrilo parece generar una mezcla de capsómeros, oligómeros más pequeños de la proteína L1 y del monómero L1, basándose en los análisis del gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20% de las VLP del HPV-16_{Tr} desmontadas (Fig. 9). Sin embargo, durante la eliminación del agente reductor por diálisis, esta mezcla de componentes pequeños, solubles es susceptible de volver a montarse en las VLP intactas con un rendimiento de ~90%, como se demostró mediante los análisis de gradiente lineal de sacarosa del 10 al 65% (Fig. 10), y cómo se confirmó mediante el análisis microscópico electrónico (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que las VLP pueden desmontarse a nivel de capsómeros, o incluso oligómeros de L1 más pequeños, y todavía ser competentes para volver a montarse en las VLP intactas, de tamaño natural, siempre que las condiciones de desmontaje generen proteínas L1 solubles, plegadas correctamente.

ES 2 268 787 T3

TABLA 1

Desmontaje de las VLP L1 de HPV-11; efectos de los agentes reductores^a

Condición de desmontaje	NaCl 0,15 M		NaCl 0,3 M		NaCl 0,5 M	
	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo
Material de partida	3,8±0,7	96,3±0,8	3,2±1,4	96,8±1,4	4,2±0,3,4	95,9±0,6
βME al 5%, 16 h	68,1±11	12,4±3,1	70,9±12	29,1±12	53,2±6,8	46,8±6,8
βME al 5%, 1 h	87,7±3,2	31,9±11	68,0±10	32±10	-	-
βME al 2%, 16 h	72,1±2,7	27,9±2,7	67,6±21	32,3±6,12	-	-
βME al 0,5%, 16 h	45,8±18	54,2±16	28,8±16	71,2±16	-	-
DTT 10 mM, 16 h	44,5±11	55,5±11	43,8±20	56,2±20	-	-
DTT 10 mM, 1 h	9,5±6,4	90,5±6,4	-	-	-	-
DTT 10 mM, EDTA 5 mM, 16 h	55,9±6,2	44,1±6,2	-	-	-	-

^aSe trataron las VLP (0,5 a 1,0 mg/ml de proteína) como se indicó a 4°C , y la distribución de L1 en todo el gradiente de sacarosa al 30% se determinó como se describe en el apartado Métodos. Se muestran los medios de las determinaciones múltiples (n=3-7) ± la desviación estándar.

TABLA 2

Desmontaje de las VLP L1 de HPV-11; efectos de los quelantes y tampones^a

Condición de desmontaje	Superficie	Fondo
EDTA 200 M, pH 7,4	4±3	96±3
EDTA 200 mM, DTT 10 mM	10±6	90±6
EGTA 200 mM, pH 7,4	13±11	87±11
EGTA 200 mM, DTT 10 mM	11±6	89±6
NaHCO ₃ 200 mM, pH 9,6	81±2	19±2
NaHCO ₃ 200 mM, DTT 10 mM	74±11	26±11
Glicina 200 mM, pH 9,6	11±1	89±1
Glicina 200 mM, DTT 10 mM	41±12	59±11

^aSe trataron las VLP (0,5 a 1,0 mg/ml de proteína) como se indicó durante 16 horas a 4°C , y se determinó la distribución de L1 en todo el gradiente de sacarosa al 30% como se describe en el apartado Métodos. Se muestran los promedios de las determinaciones por duplicado ± el intervalo.

ES 2 268 787 T3

TABLA 3

Comparación de la purificación de VLP de HPV-16_{Tr} intacta y desmontada^a

Prueba	Costra	Pureza	Rendimiento	ADN
β ME	24 g	59%	5,0%	30 ng/100 μ g L1
+ β ME, serie 1	10 g	85%	10,8%	5,3 ng/100 μ L1
+ β ME, serie 2	10 g	85%	18,4%	0,6 ng/100 μ L1
+ β ME, serie 3	30 g	81%	6,1%	--

^aSe comparan una purificación de las VLP intactas ($-\beta$ ME) y tres purificaciones de las VLP desmontadas (+ β ME, series 1 a 3), y se prepararon como se describe en el apartado Métodos. Costra indica los gramos de pasta celulares utilizados, se determinó la pureza por análisis densitométrico de SDS/PAGE del producto final en comparación con la cantidad presente en la pasta celular inicial, y se determinó el ADN por el método umbral y se publica para 100 μ g de proteína L1, la dosis individual máxima esperada en el hombre.

Conclusiones

Por lo tanto, la presente invención proporciona condiciones precisas para el desmontaje cuantitativo y el reensamblaje posterior de las VLP de papilomavirus *in vitro*. Como se expuso, los intentos iniciales en el desmontaje de VLP del papiloma estuvieron en alguna medida influenciados por el trabajo realizado en el poliomavirus, un papovavirus citado, donde se demostró que tanto la reducción de disulfuros como la quelación de los iones de calcio eran esenciales para el desmontaje del virión (Brady *et al.*, *J. Virol.*, (1977)). Sin embargo, se descubrió sorprendentemente que las bajas concentraciones de agente reductor (DTT 1-10 mM) óptimas para el desmontaje del poliomavirus en presencia de bajas concentraciones de agentes quelantes (p. ej., EDTA 0,5-10 mM) fueron sólo ligeramente eficaces en el desmontaje de las VLP del papiloma (Tabla 1, Li *et al.*, (*id.*) (1997)), aunque las VLP L1 de HPV-11 parcialmente tripsinizadas fueron disociadas por las condiciones anteriores (Li *et al.*, (*Id.*) 1997)). Sin embargo, Sapp y colaboradores demostraron que podrían generarse capsómeros a partir de las VLP de HPV-33 por tratamiento de agente reductor solo (DTT 20 mM), si bien no se determinó la extensión de la destrucción de VLP (Sapp *et al.*, (*Id.*) 1995)). En los experimentos expuestos anteriormente, se descubrió que cuando se examina el desmontaje por análisis del gradiente, fue necesario demostrar la presencia de la proteína L1 en el "sedimento". En muchos casos, el examen de las fracciones en todo el gradiente sugirió que se había conseguido buena descomposición. Sin embargo, el examen del sedimento, aun cuando no fue visible, indicó que un gran porcentaje de la proteína estaba todavía en forma de las VLP de tamaño variable o aglomeradas de otro modo, como se confirmó por análisis al microscopio electrónico. El desarrollo del análisis en gradiente de sacarosa al 30% permitió a los solicitantes identificar rápidamente un número de condiciones de desmontaje e identificar las que desmontaron regularmente las VLP en componentes solubles más pequeños. Se descubrió que el desmontaje cuantitativo a una solución homogénea de capsómeros aislados (para las VLP del HPV-11) o una mezcla de capsómeros y de oligómeros L1 más pequeños plegados correctamente y de monómeros L1 (VLP de HPV-16_{Tr}) podría conseguirse regularmente mediante tratamiento prolongado de las VLP no aglomeradas con grandes niveles de agente reductor en tampones de fuerza iónica moderada a baja.

Como se expuso, la observación de que la quelación de los cationes no afectaba materialmente el desmontaje de VLP de HPV-11 fue sorprendente ya que está en contraste con los estudios iniciales con poliomavirus que indicaban que la quelación del calcio estimulaba el desmontaje del virión y que el calcio añadido podía superar el efecto de los quelantes (Brady *et al.* (*id.*) (1997)). Asimismo, Montross *et al.*, (*Id.*) (1991), observó que las VLP del poliomavirus, que normalmente se ensamblan solamente en el núcleo, podían formarse en el citoplasma después de la adición de un ionóforo de calcio, que supuestamente aumentaba la concentración de calcio en el citoplasma a la concentración necesaria. Sin embargo, el calcio no es aparentemente importante para la estabilidad del cápsido L1 del HPV-11. Por el contrario, el tratamiento con tampón de carbonato a pH alcalino "desmontó" las VLP L1 del HPV-11, de modo similar a los resultados observados con los viriones del poliomavirus (Brady *et al.*, (*Id.*) (1997)). Sin embargo, este tratamiento parece más severo, ya que las VLP no pudieron regenerarse por diálisis en PBS-NaCl 0,5 M siguiendo el tratamiento con carbonato.

El desmontaje de VLP del HPV-11 mediante el tratamiento con carbonato redujo la proteína L1 que no pudo reaccionar con los anticuerpos monoclonales específicos de HPV-11, dependientes de la estructura. En cambio, el desmontaje de las VLP L1 de HPV-11 por reducción prolongada produjo capsómeros que poseían epítomos específicos de la estructura hallados en la superficie tanto de las VLP L1 de HPV-11 como de los viriones HPV-11. Estos resultados apoyan la idea de que solamente la proteína L1 plegada correctamente conserva la capacidad para reensamblarse en las VLP.

Para reensamblar las VLP de tamaño natural de manera eficaz *in vitro*, los resultados expuestos en la presente memoria indican que la integridad estructural, la solubilidad y la homogeneidad del material de partida son significativas.

Después de la generación de dicha población de capsómeros (para las VLP de HPV-11) o una mezcla de capsómeros y los oligómeros de L1 más pequeños plegados correctamente y los monómeros de L1 (VLP de HPV-16_{Tr}) mediante reducción del tiol, el reensamblaje se produce espontáneamente en el momento de la eliminación del agente reductor. El reensamblaje se consiguió eliminando el agente reductor sulfhidrilo, por métodos cromatográficos en columna o por diálisis frente a un gran exceso de tampón, proporcionando una población de VLP reensambladas, de tamaño natural, más homogéneas en tamaño que el material de partida VLP. En los estudios iniciales de poliomavirus, Salunke *et al.*, (1989) observaron que el montaje de VLP de los capsómeros proporcionó múltiples montajes icosaédricos polimórficos en función de las condiciones del montaje (pH, fuerza iónica y concentración de calcio). Resulta interesante que la mayor parte de la estructura formada regularmente era un icosaedro capsómero 24 así como un icosaedro capsómedro 12, además del icosaedro capsómero 72 del cápsido vírico. Los autores observaron que la formación del enlace disulfuro puede anidar en el montaje de VLP del poliooma pero que no es esencial, ya que a elevada fuerza iónica (sulfato de amonio 2 M) se formaron cápsidos de tamaño variable incluso en presencia de β ME 15 mM, Li *et al.*, (1997), han observado que los capsómeros de HPV-11 purificados en columna expresados en *E. coli* tienen capacidad para formar estructuras de tipo cápsido en NaCl 1 M, de nuevo en presencia de β ME 15 mM. Sin embargo, aunque las condiciones de fuerza iónica elevada favorecen aparentemente algún grado de formación de la cápside, es evidente a partir de los estudios de los solicitantes que a la fuerza iónica fisiológica, los enlaces disulfuros son necesarios para soportar las VLP L1 de HPV-11 y de HPV-16_{Tr} conjuntamente.

Incluso dado que las reacciones de desmontaje se realizaron típicamente a 4°C sin agitación, es interesante que el desmontaje máximo requirió exposición prolongada a muy altas concentraciones de agente reductor. Como los solicitantes expusieron anteriormente, la explicación más probable es que los enlaces disulfuro estabilizantes están ocultos y son inaccesibles, y la exposición de estos enlaces al disolvente por fluctuaciones estructurales locales es muy infrecuente.

La capacidad para volver a montar las VLP de tamaño natural en conjunto abre numerosas posibilidades. Como se presenta en la Fig. 7, a altas dosis las VLP reensambladas son susceptibles de producir anticuerpos neutralizantes de virus como material de partida de VLP purificada. Los solicitantes están actualmente experimentando la potencia de las VLP reensambladas, para determinar si son inmunógenos tan potentes como el material de partida de VLP purificado, que es menos homogéneo en tamaño de partícula. Mientras que un número de partículas diferentes en tamaño y aspecto se observan en el núcleo de las células después de la infección *in vivo* (Kiselev *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 40:155-171, (1969)), supuestamente sólo los virus de tamaño natural son infecciosos de manera productiva. Como se expuso, las presentes VLP reensambladas pueden presentar en potencia mayor estabilidad debido al presente método que proporciona más partículas uniformes de VLP. Además, como expusieron los solicitantes anteriormente, la reacción de reensamblaje puede aumentarse más en potencia variando la concentración de proteína, el pH, la fuerza iónica y la cinética, ambos para optimizar el reensamblaje en un intervalo mayor de condiciones de partida. Por último, la presente invención permite el encapsulado de compuestos exógenos en el interior de las VLP realizando la reacción de reensamblaje en presencia de una solución concentrada del compuesto seleccionado. La presente invención, como se expuso anteriormente, puede utilizarse para generar pseudoviriones para su utilización como sustitutos para varios virus HPV que no están actualmente disponibles, o como un sistema de administración de fármacos o de otros compuestos de destino.

La invención puede materializarse en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o de las características esenciales. Las formas de realización descritas deben considerarse desde todos los puntos de vista únicamente a título ilustrativo y no limitativo, y el alcance de la invención está indicado, por consiguiente, por las reivindicaciones adjuntas mejor que mediante la descripción anterior. Todas las modificaciones que están comprendidas dentro del significado y el intervalo de la equivalencia legítima de las reivindicaciones están comprendidas en este alcance.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la producción de composición que contiene una partícula similar a virus homogénea de papilomavirus (VLP), método que comprende las etapas siguientes:

(i) desmontaje de una composición que contiene la partícula similar a virus (VLP) tratando dicha composición que contiene la partícula similar a virus con una solución que comprende un agente reductor sulfhidrilo para desmontar dichas VLP; y

10 (ii) reensamblaje de dichas VLP desmontadas mediante la eliminación u oxidación del agente reductor sulfhidrilo, en la que dichas VLP reensambladas son capaces de producir anticuerpos neutralizantes del virus.

15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la solución para el desmontaje en la etapa (i) presenta una fuerza iónica que no excede de 0,50 M.

3. Método según la reivindicación 2, en el que la solución para el desmontaje en la etapa (i) presenta una fuerza iónica que no excede de 0,15 M.

20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas VLP de papilomavirus son las VLP de papilomavirus humano.

25 5. Método según la reivindicación 4, en el que dichas VLP de papilomavirus humano se seleccionan de entre el grupo constituido por HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-41, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-45, HPV-52, HPV-54, HPV-55, HPV-56, HPV-70 y mezclas de los mismos.

6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha VLP de papilomavirus humano es una VLP del HPV-16.

30 7. Método según la reivindicación 5, en el que dichas VLP de papilomavirus humano son una mezcla de HPV-16 y HPV-18.

8. Método según la reivindicación 1, en el que dichas VLP comprenden la proteína L1 o la forma truncada en el terminal-C de la proteína L1 del HPV-16.

35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha puesta en contacto con una solución que comprende por lo menos un agente reductor de sulfhidrilo es durante un periodo de tiempo prolongado suficiente para producir por lo menos 70% de desmontaje de dichas VLP en moléculas más pequeñas que contienen la proteína L1 y/o formas de la proteína L1 mutadas y/o alteradas químicamente.

40 10. Método según la reivindicación 9, en el que dichas VLP de papilomavirus comprenden una o más proteínas L1, proteínas L1 mutadas y proteínas L1 alteradas químicamente; y comprende proteínas L2.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente reductor sulfhidrilo está oxidado o se elimina por diálisis, diafiltración o cromatografía en columna.

45 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de agente reductor en la etapa (i) es por lo menos de 1% en peso.

50 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente reductor sulfhidrilo se selecciona de entre el grupo constituido por glutatión, ditioneitol, β -mercaptoetanol, ditioeritritol, cisteína, sulfuro de hidrógeno y mezclas de los mismos.

55 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en la que dichas fracciones más pequeñas que contienen la proteína L1 se purifican produciendo de esta manera partículas similares a virus (VLP) purificadas de papilomavirus en el reensamblaje.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las VLP se purifican en estado desmontado y se reensamblan en el estado deseado de pureza.

60 16. Método según la reivindicación 1, en el que la VLP de papilomavirus es el HPV-16 y después de la producción de las VLP homogéneas del HPV-16 dichas VLP se combinan con las VLP del HPV-18 para proporcionar una composición que comprende las VLP de HPV-16 y HPV-18.

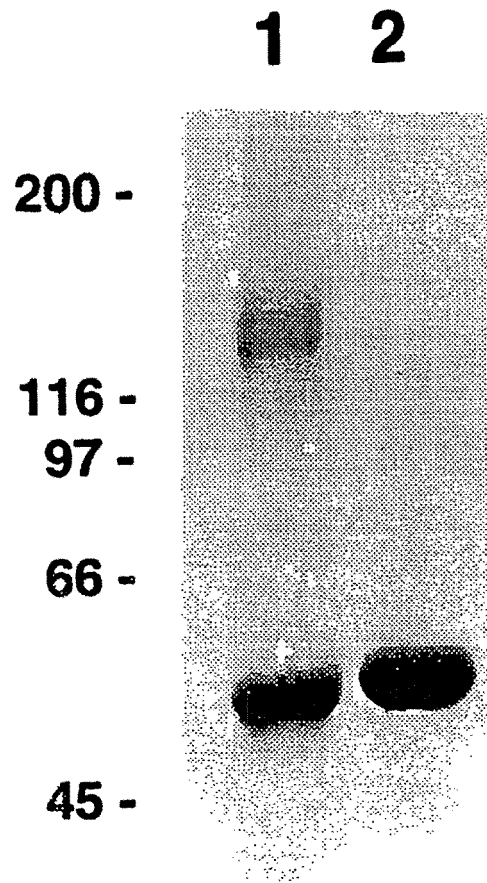


Fig. 1

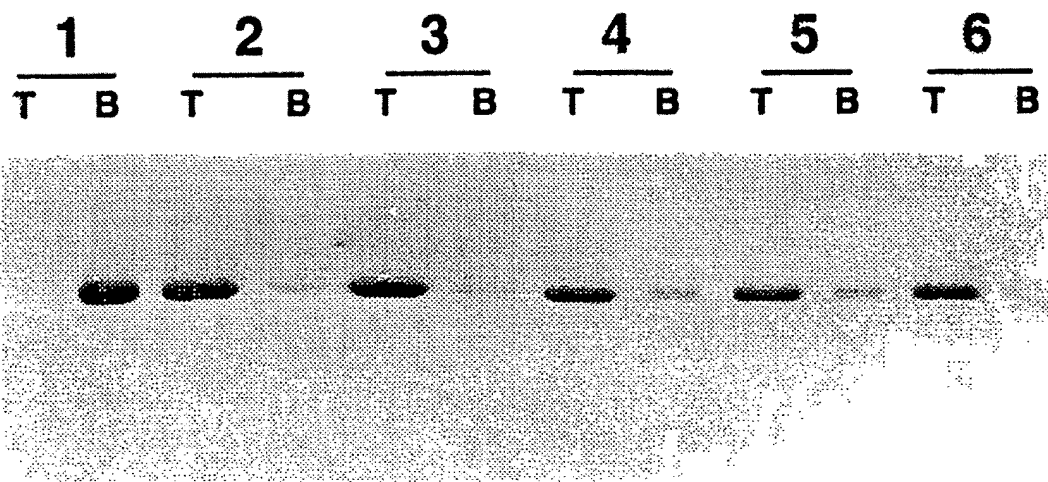


Fig. 2

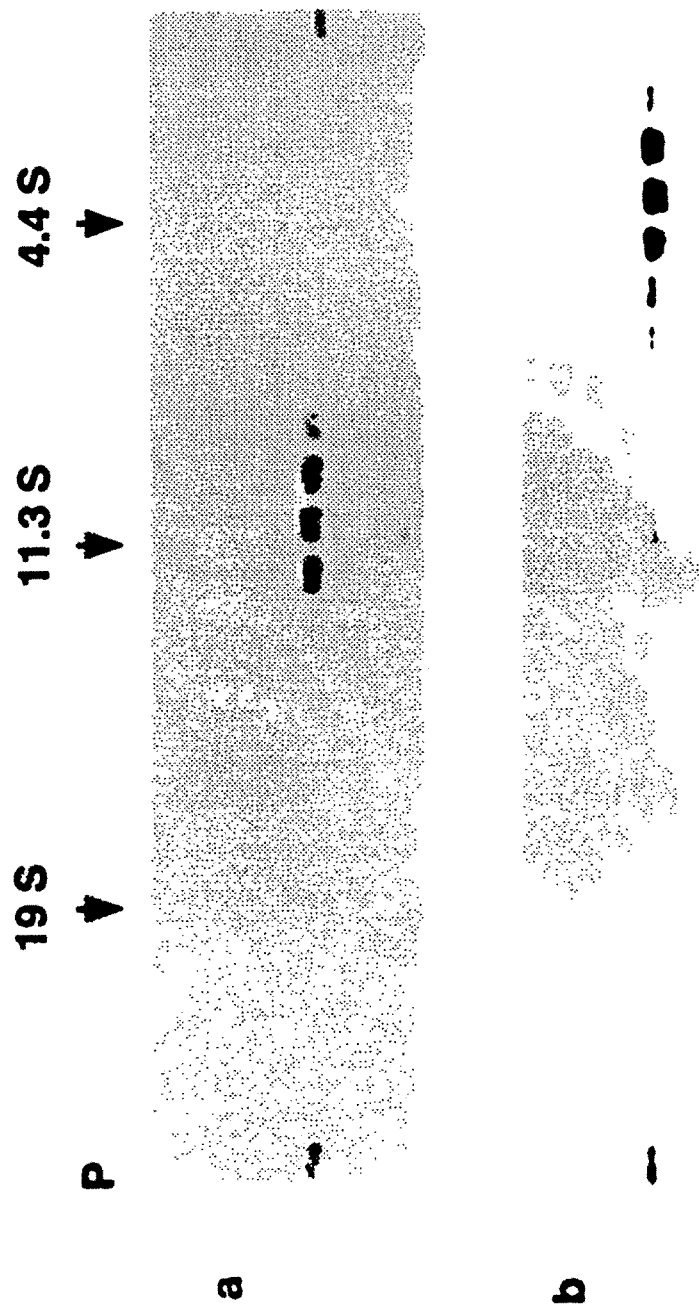


Fig. 3

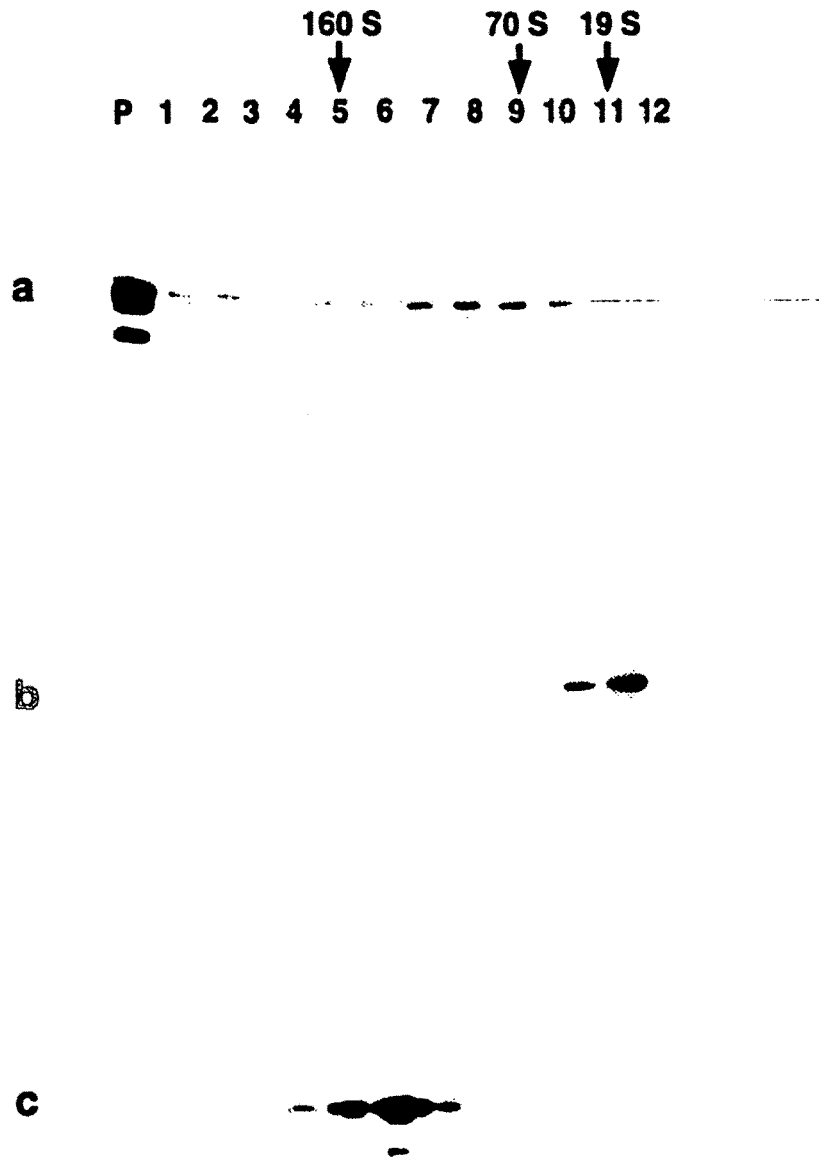


Fig. 4

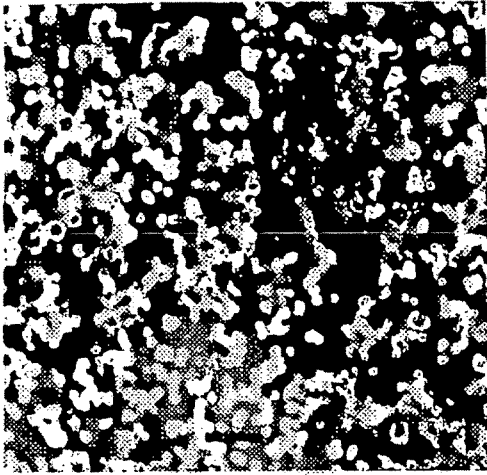


Fig. 5A

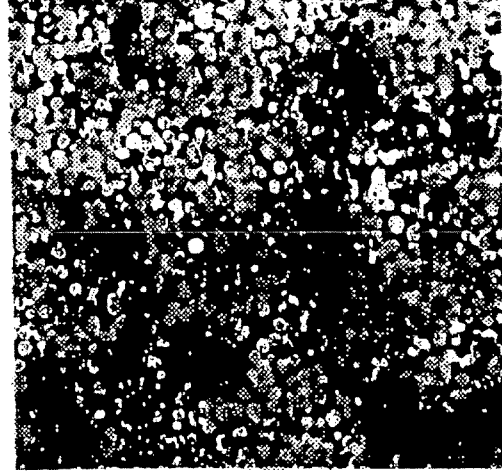


Fig. 5C

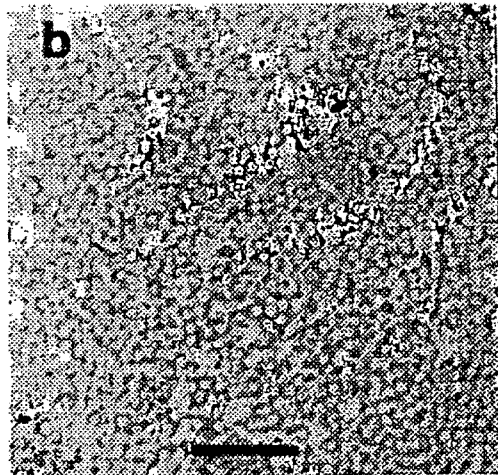


Fig. 5B

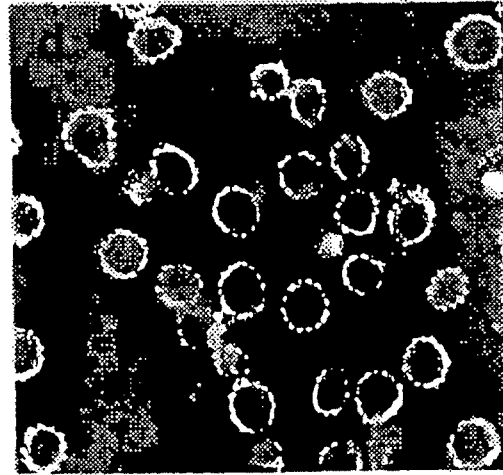


Fig. 5D

FIG. 6A

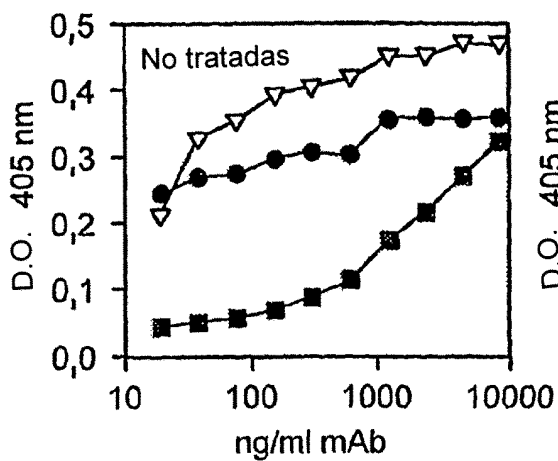


FIG. 6B

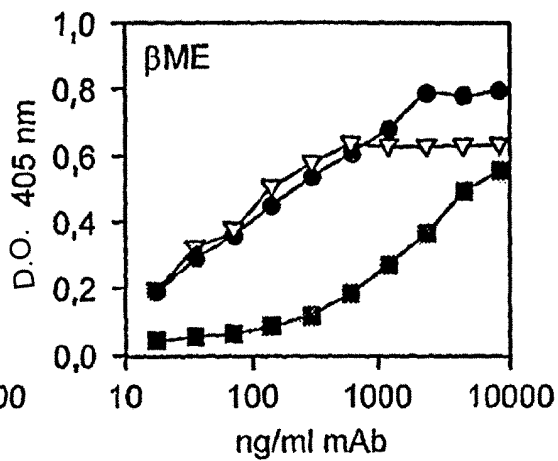


FIG. 6C

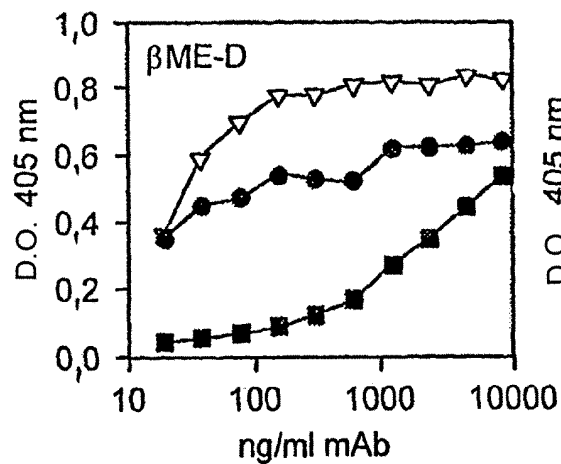
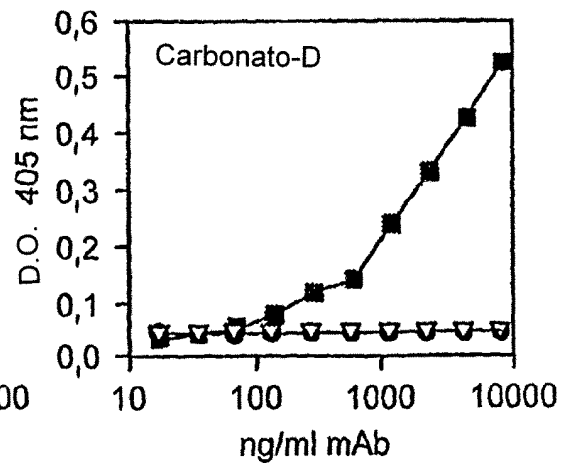


FIG. 6D



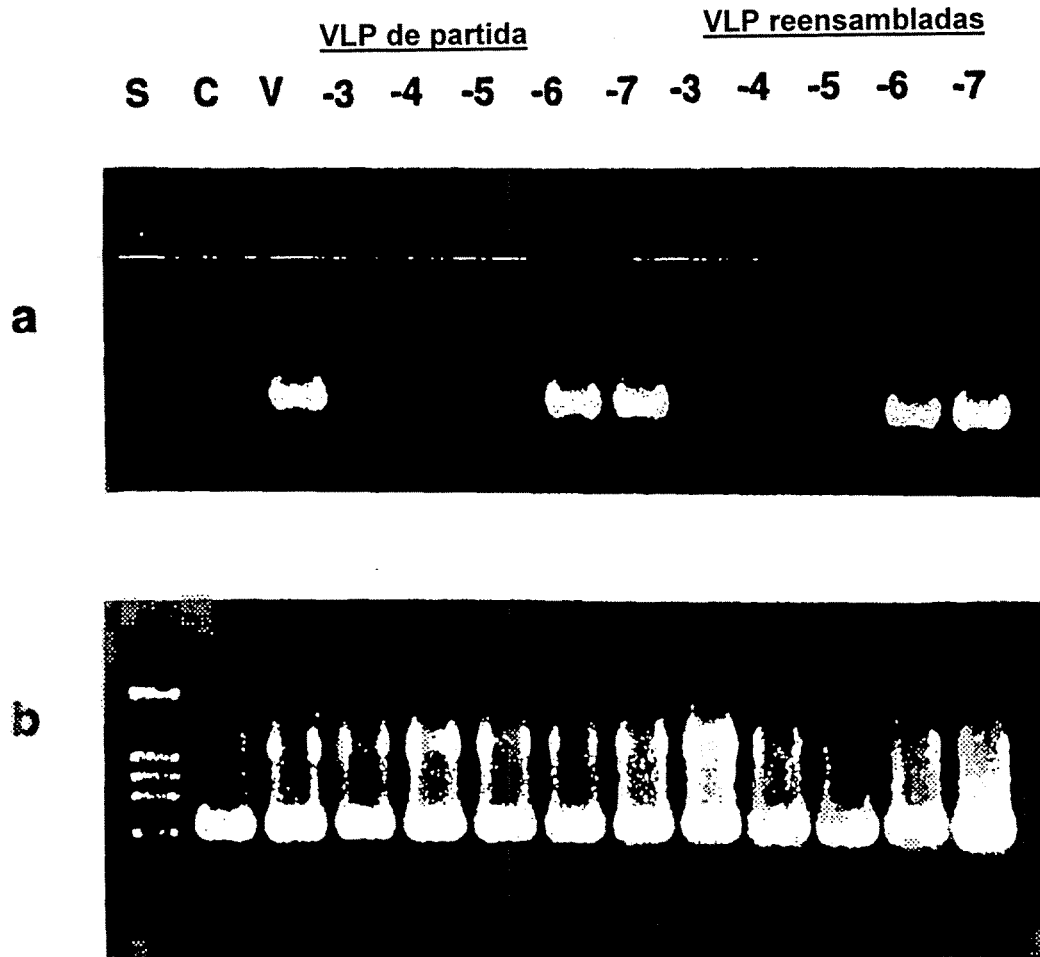


Fig. 7

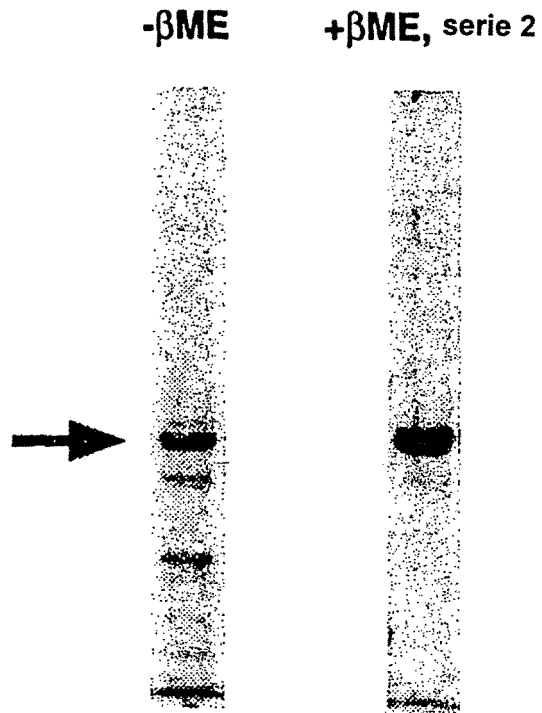


Fig. 8

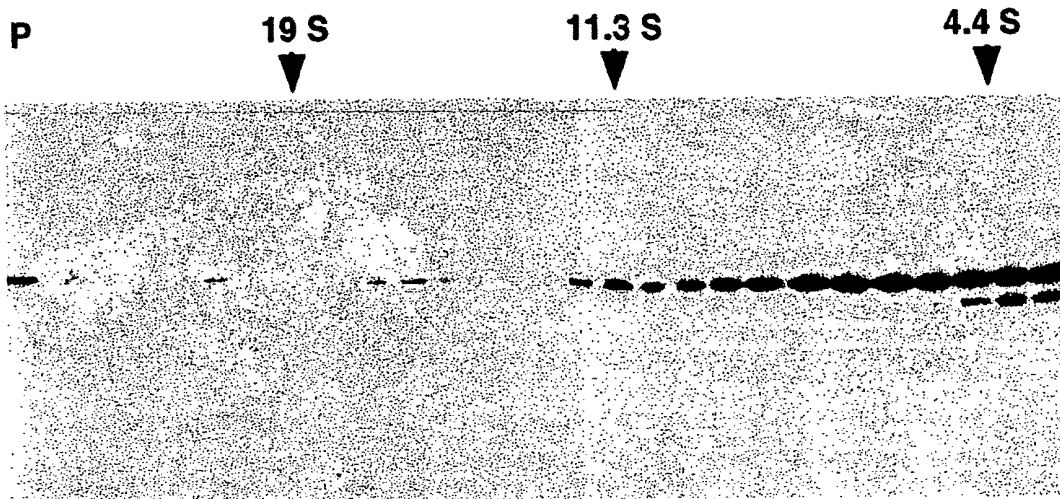


Fig. 9

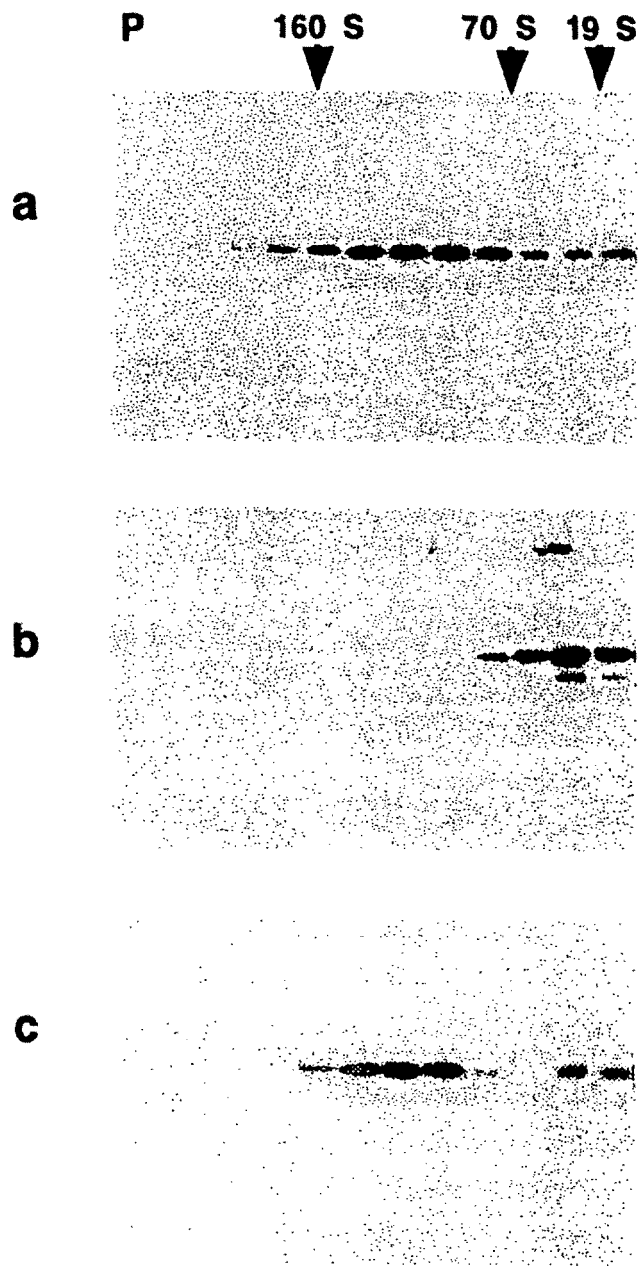


Fig. 10