



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 267 890**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/37 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02009841 .4**

(86) Fecha de presentación : **20.07.1992**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1298211**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

(54) Título: **Segmento polinucleótido de genoma HPV16.**

(30) Prioridad: **19.07.1991 AU PK7322/91**

(73) Titular/es: **The University of Queensland
St. Lucia, Queensland 4072, AU
CSL LIMITED**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

(72) Inventor/es: **Frazer, Ian y
Zhou, Jian**

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

(74) Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 267 890 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

Segmento polinucleótido de genoma HPV16.

5 Campo de la invención

Esta invención se relaciona con virus de papiloma y en particular con antígenos y vacunas que pueden ser eficaces para tratar infecciones causadas por tales virus.

10 Contexto de la invención

Las infecciones causadas por virus de papiloma se conocen no sólo en humanos sino también en animales tales como ovejas, perros, ganado, coyotes, zorros, comadrejas, ciervos, antílopes, jirafas, impalas, elefantes, ballenas, gatos, cerdos, jirbos, alces, yacs, delfines, loros, cabras, rinocerontes, camellos, lemmings, gamuzas, mofetas, diablos de Tasmania, tejones, lémures, caribúes, armadillos, tritones, y serpientes (ver por ejemplo "Papilloma Virus Infections in Animals" por J. P. Sundberg donde se describe los virus de papiloma y enfermedades humanas, editado por K. Syrjanen, L. Gissman y L. G. Koss, Springer Verlag 1987).

También se conoce (por ejemplo, en "Papilloma viruses and Human Cancer" editado por H. Pfister y publicado por CRC Press Inc 1990) que los virus de papiloma se incluyen en varios grupos distintos tales como Virus Humano del Papiloma (HPV) que se diferencian en tipos 1-56 dependiendo de la homología de secuencia de ADN. Un grupo clínico patológico de HPV y el potencial maligno de las lesiones con las que se asocian normalmente pueden separarse del siguiente modo.

Se colocan en un primer grupo el tipo 1 y 4 que causan verrugas benignas en la planta del pie, tipos 2, 26, 28 y 29 que causan verrugas comunes benignas, tipos 3, 10 y 27 que causan verrugas planas benignas y tipo 7 que causa verrugas del carníero. El primer grupo de infecciones se da en individuos normales o inmunocompetentes.

Un segundo grupo se refiere a individuos que tienen un sistema inmune que ha sido deteriorado por enfermedad o tratamiento y se colocan en los Tipos 5 y 8 que causan lesiones maculares altamente malignas, Tipos 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36 y 46-50 que causan lesiones maculares o planas que son benignas o raramente malignas. Estas lesiones maculares son también conocidas como epidermodisplasia verruciformis (EV).

En un tercer grupo que afectan en concreto al tracto genital se clasifican los Tipos 6, 11, 34 y 39, 41-44, y 51-55 que causan condilomas que raramente son malignas, Tipos 13 y 32 que causan hiperplasia epitelial focal benigna, Tipos 16 y 18 que causan displasia epitelial y otras lesiones con potencial considerable y que incluyen Papulosis Bowenoid, y Tipos 30, 31, 33, 35, 45 y 56 que causan condilomata con potencial maligno intermedio. El condilomata aparece en la mayoría de los casos en el tracto anogenital y en particular el cuello del útero. Tipos 16 y 18 se asocian con la mayoría de carcinomas *in situ* e invasivos del cuello del útero, vagina, vulva y canal anal. Las condilomata también pueden darse en el tracto aerodigestivo.

En particular, HPV16 está asociado con enfermedades premalignas y malignas del tracto genito-urinario, en particular con carcinoma del cuello del útero (Durst *et al.*, PNAS 80 3812-3815, 1983; Gissmann *et al.*, J. Invest. Dermatol. 83 265-285, 1984). Actualmente, no existe información acerca del papel de respuestas humorales en la neutralización de HPV16.

La detección de anticuerpos contra proteínas de fusión HPV16 (Jenison *et al.*, J. Virol. 65 1208-1218, 1990; Köchel *et al.*, Int. J. Cancer 48 682-688, 1991) y péptidos sintéticos HPV16L1 (Dillner *et al.*, Int. J. Cancer 45 529-535, 1990) en el suero de pacientes con infección HPV16 confirma que hay epitopes B dentro de proteínas de cápsido de HPV, aunque unos pocos pacientes tienen anticuerpos específicos a HPV16L1 identificados por estas técnicas. No hay sistema para la propagación *in vitro* de HPV16, y las lesiones genitales humanas producen muy pocos viriones HPV16; por lo tanto, partículas HPV16 no han estado disponibles para estudios inmunológicos.

Los Virus de Papiloma Animal también pueden incluir Virus de Papiloma Bovino (BPV) y en particular tipos BPV1, BPV2, BPV3, BPV4, BPV5 y BPV6 que también se diferencian por la homología de la secuencia de ADN. En general, otros virus de papiloma animal infectan a ciervos, caballos, conejos, perros, roedores y pájaros. Los Virus de Papiloma son pequeños virus de ADN que codifican hasta 8 genes tempranos y dos genes tardíos. (Para informes mirar Lancaster and Jenson 1987 Cancer Metast. Rev. P. 6653-6664; y Pfister 1987 Adv. Cancer Res. 48, 113-147). La organización de los genes tardíos es más simple que la de los genes tempranos. Los genes tardíos L1 y L2 se sobreponen ligeramente en la mayoría de los casos. Las proteínas putativas L2 están altamente conservadas entre diferentes virus de papiloma, en particular la secuencia de 10 aminoácidos básicos en el extremo C-terminal. El amplio dominio en la mitad revela solamente pequeñas similitudes agrupadas. En cambio, L1 ORF aparece de modo monótono conservado en todos los casos conocidos. (Ver Syrjanen *et al.*, anteriormente). La homología de secuencia de aminoácido alcanza el 50% en comparación con HPV1 a, HPV6b, BPV1 y CRPV (Virus de Papiloma de cola de algodón de conejo).

En lo relativo a la inmunoterapia que rodea las infecciones de virus de papiloma anteriores a métodos de tratamiento de verrugas y lesiones epiteliales de piel se ha empleado cirugía puede llegar a ser dolorosa y traumática que

- suele conllevar cicatrices y el riesgo de que la infección se reproduzca. También se han empleado tratamientos con productos químicos. Un agente común de tratamiento es el ácido salicílico que es el principal ingrediente en resistencias entre 10% t 40% en tinturas y escayolas. También se ha propuesto formalina en resistencias de 3% a 20%. Se ha usado crioterapia para tratamientos de verrugas en la piel. También se ha usado glutaraldehído como agente de tratamiento. De igual modo se ha empleado podofilina obteniendo un éxito variable tanto para verrugas cutáneas como para condilomata autogenital. Los tipos de cirugía que se ha empleado en condilomata autogenital ha incluido corte quirúrgico, criocirugía y cirugía por láser. También se ha propuesto el uso de interferones (ver Syrjanen *et al.*, anteriormente).
- 10 Anticuerpos con la proteína L1 de papiloma virus bovino (BPV) tienen actividad de neutralización de virus (Pilacinski *et al.*, 1986) y viriones HPV11 pueden desactivarse en un modelo *in vitro* por antisero específico (Christensen and Kreider, J. Virol 64 3151- 3156, 1990). También hay pruebas de que la regresión espontánea de verrugas cutáneas inducidas por HPV1 se asocia con el aumento de respuestas inmunes humorales a la proteína de la verruga (Kirchner, Prog. Med. Virol 33 1-41, 1986).
- 15 También se han propuesto vacunas con éxito indiferente: Se ha propuesto emplear vacunas que contienen homogeneizados de tumor autógenos [Abacarian *et al.*, J. Surg. Res. 22: 231-236 (1977) Dis Colon Rectum 25: 648-51 (1982) Dis Colon Rectum 19: 237-244 (1976)]. Sin embargo, recientemente se reflejó que no es aconsejable continuar usando vacunas autógenas debido al potencial efecto oncogénico del ADN viral (Bunney 1986 Br. Med. J. 293 1045-1047).
- 20 En relación con la producción de vacunas de ingeniería genéticas, el tema ha sido debatido en Pfister (1990), mencionado anteriormente, y parece que ha habido dificultades para obtener una vacuna eficaz debido a la pléthora de los diferentes tipos de virus de papiloma. Sin embargo, Pfister señala que la atención debe dirigirse a las llamadas proteínas tempranas (es decir, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8) ya que estas proteínas tienen más posibilidades de sintetizarse en las células basales de proliferación de la infección de verruga en contraste con las proteínas estructurales que se expresan en las capas superiores de la epidermis. Por lo tanto, de acuerdo con Pfister (1990) la proteína de cápsido de virus parece estar limitada en relación con el uso en la vacuna. Pfister (1990) también ha debatido el empleo de virus recombinantes de vacuna en sistemas de test *in vitro* para proteínas tempranas de virus de papiloma en células eucarióticas. Esto puede tomar la forma de una vacuna viva que consiste en virus de vacunas modificados genéticamente que expresen proteínas de virus de papiloma o en la superficie de paraformaldehído fijada a células autólogas infectadas *in vitro* con recombinantes de vacunas o transfectadas con otros vectores de expresión. Otra estrategia para el desarrollo de vacunas, como ya señaló Pfister (1990), es el uso de un complejo estimulador inmune de glicosida Quil A.
- 25 30 35 40 Sólo existen datos sobre vacunas profilácticas exitosas para homogenizado de fibropapilomas bovinos y se han mostrado para proporcionar inmunidad limitada (Olson *et al.*, J. Am. Vet. Me. Assoc. 135, 499 (1949) Cancer Res. 22 463 (1962). También se ha empleado una vacuna que incluye una proteína de fusión LI de ingeniería (Pilacinski *et al.*, UCLA Symp. Molecular and Cellular Biology New Series Vol. 32 Papilloma Viruses Molecular and Cellular Aspects Alan R. Liss New York 1985 257) en terneros pero no tuvieron éxito en humanos (Barthold *et al.*, J. Am. Vet. Med. Assoc. 165, 276, 1974). En Pfister (1990) se señala que actualmente no existen pruebas para una posible prevención de infección HPV mediante el uso de una vacuna de proteína cápsida, pero la inducción de inmunidad de célula antitumoral parece ser factible.
- 45 Los genes L1 y L2 han sido la base de vacunas para la prevención y el tratamiento de infecciones de virus de papiloma e inmunogenes empleados en el diagnóstico y detección de virus de papiloma (International Patent Specifications WO8605816 y WO8303623). Sin embargo, parece que no existe un uso comercial de dichas vacunas.
- Resumen de la invención**
- 50 Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar virus como partículas (VLPs) que pueden ser útiles como agentes de diagnóstico así como para formar un componente de una vacuna para uso con infecciones de virus de papiloma.
- 55 Por consiguiente, la invención incluye por un lado un método de producción de partículas similares a virus de papiloma (VLPs) que incluyan los siguientes pasos:
- 60 (i) construcción de una o más moléculas recombinantes de ADN codificando cada una de ellas la proteína L1 del virus del papiloma o una combinación de proteína L1 de virus de papiloma y proteína L2 de virus de papiloma; y
 - (ii) transfección de una célula huésped adecuada con dichas o más moléculas recombinantes de ADN para que las partículas similares a virus (VLPs) se produzcan dentro de la célula después de la expresión de L1 o combinación de proteínas L1 y L2.
- 65 La invención incluye por otro lado una vacuna que contiene el virus de papiloma VLPs en combinación con un adyuvante adecuado.

ES 2 267 890 T3

En relación con el paso (i) solamente se necesita la proteína L1 del virus del papiloma para formar VLPs de algunos virus de papiloma. De modo adecuado únicamente se necesita la proteína L1 para formar VLPs de BVP1, HPV11 y HPV6 incluyendo HPV6b. Sin embargo, VLPs también pueden formarse en relación con BPV1, HPV11 o HPV6b que contiene tanto proteína L1 como L2. Para la formación de VLPs de otros virus de papiloma como HPV16, tanto la proteína L1 como L2 son necesarias. Esta situación también se puede aplicar a HPV18 que tiene síntomas patológicos similares a HPV16 y también a la homología de secuencia de ADN. Además, se apreciará que los genes L1 y L2 pueden incluirse en la misma molécula recombinante de ADN en diferentes moléculas recombinantes de ADN.

Preferentemente, las moléculas de ADN recombinantes están contenidas en virus recombinante que pueden transfectar la célula huésped. Virus adecuados que pueden emplearse para este propósito incluyen baculovirus, vaccinia, virus sindbis, SV40, virus Sendai, adenovirus, retrovirus o poxvirus. Células huésped adecuadas incluyen células huésped que son compatibles con los virus mencionados y entre estos se incluyen células de insectos como *Spodoptera frugiperda*, células CHO, fibroblastas de embrión de pollo, células BHK, células humanas SW13, drosophila, células de mosquito derivadas de *Aedes albopictus* o células epiteliales de mono. También se podrá apreciar que otras células eucarióticas pueden comprender células de levadura u otros mamíferos.

La molécula recombinante de ADN se obtiene de modo adecuado a partir de una fuente del genoma de virus de papiloma por medio del cual la proteína L1 o proteína L2 puede amplificarse por amplificación PCR empleando cebos perfectamente diseñados que se describirán posteriormente. Preferentemente, un gen que codifica la proteína L1 se inserta en un plásmido que contiene un promotor adecuado y un fragmento de ADN que contiene la proteína L1 y el promotor se inserta en un plásmido primaria que puede constituir la molécula de ADN recombinante que puede insertarse en un vector de virus recombinante tal y como se ha descrito anteriormente.

Un gen que codifica la proteína L2 puede también estar unido a un promotor adecuado y preferentemente a un fragmento de ADN que incorpora el gen L2 y el promotor se inserta en el plásmido primaria para proporcionar un plásmido doblemente recombinante o plásmido secundario que puede insertarse en un vector de virus recombinante como se ha descrito anteriormente para formar un vector de virus doblemente recombinante.

A pesar de que la invención también incluye la realización donde el plásmido primario y/o el plásmido secundario pueden infectar una célula huésped para producir VLPs que contienen proteína L1 o VLPs que contienen proteína L1 y L2 bajo condiciones experimentales adecuadas. Estas últimas VLPs son el inmunógeno ideal para una vacuna específica del virus del papiloma, ya que la proteína L2 es inmunodominante en infección natural.

Otras moléculas recombinantes de ADN adecuadas incluyen cósmidos así como virus recombinantes. Sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión procariótico que incluye *E. coli* y cualquier vector de expresión de plásmido o cósmido o sistemas eucarióticos que incluyen células huésped descritas anteriormente en combinación con un vector de virus recombinante o de manera alternativa células de levadura y plásmidos de levadura.

En la situación donde los plásmidos que se emplean incorporan genes que codifican L1 o L2 o ambos L1 y L2 y donde tales plásmidos pueden infectar una célula huésped adecuada para la producción de VLPs como plásmidos deberían incluir un promotor adecuado para mejorar la expresión de las proteínas estructurales VLP y una polimerasa también puede utilizarse cuando está asociada con el promotor relevante. Sin embargo, en esta situación VLPs pueden únicamente obtenerse bajo condiciones experimentales adecuadas.

Los genes L1 y L2 salen de cualquier promotor mamífero o viral con una señal de poliadenilación mamífero o viral. Preferentemente, los genes L1 y L2 se transcriben de cualquier promotor de virus de vacuna que puede ser un promotor temprano o promotor tardío según se considere apropiado. Se propone una lista de tales promotores en Division and Moss (1989) J. Mol. Biol. 210 749-769 y (1989) J. Mol. Biol. 210 771-784.

En el trabajo experimental que se ha llevado a cabo el gen L1 está situado en dirección descendente con respecto al promotor de vacuna 4b y el gen L2 está situado en dirección descendente con respecto a un promotor tardío 28k de vacuna sintética. Las células huésped son células epiteliales de mono.

Los VLPs se pueden obtener a partir de las células transfectadas a través de medios adecuados de purificación. Los VLPs pueden combinarse con cualquier adyuvante adecuado como por ejemplo ISCOMS, alumbre, Adyuvante Completo o Incompleto de Freund, Quil A u otros saponinos o adyuvantes descritos por ejemplo en Vansel (1987) S. Vet. Bull. 57 881-896.

A continuación se hacen referencias a varias realizaciones preferentes de la invención tal y como se muestra en los dibujos adjuntos. En estas realizaciones preferentes se observa que se usan como ejemplo los virus específicos de papiloma, VLPs y constructos específicos de moléculas de ADN recombinantes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de plásmidos usados para construir virus de vacuna recombinante HPV16.

La Figura 2A es un análisis western blot de HPV16 L1 recombinante en células de virus de vacuna CV-1.

ES 2 267 890 T3

La Figura 3 es un análisis northern blot de células CV-1 infectadas de virus de vacuna recombinante.

Las Figuras 4A y 4B son microscopia de electro de partículas similares a virus HPV de células CV-1 infectadas con virus de vacuna recombinante.

5 La Figura 5 muestra CsCl equilibrio-densidad sedimentación gradiente de HPV16 cápsido vacío.

La Figura 6 muestra Glicosilación de proteínas L1 en partículas de virus purificadas.

10 La Figura 7 es un diagrama de flujo de las construcciones de plásmidos pLC200 que codifica L1 y pLC201 que codifica L1 y L2.

15 La Figura 8 es un análisis western blot de la reactividad de suero murina con proteína L1 recombinante de baculovirus. Las Figuras 9 y 10 muestran resultados de encuadre para suero de BLAB/c, C57B1/6, y ratones CBA inmunizados con cápsidos HPV 16 sintéticos y suero de control inmunizado CFA acumulado.

Las Figuras 11 y 11A muestran reactividad de dos MAbs específicos para L1 con la serie de péptidos que se superponen de la molécula HPV16 L1.

20 La Figura 11B muestra la predicción de índice antigenico de HPV16 L1.

La Figura 12 muestra un mapa epítrope de HPV16 L1.

25 La Figura 13A muestra HPV16 VLPs sintéticos como se usan para la inmunización.

La Figura 13B muestra reactividad de VLPs purificados con antisuero anti HPV16 L2 por western blot.

La Figura 13C muestra plásmidos empleados para construir virus de vacuna recombinante en relación con BPV1.

30 Las Figuras 14A y 14B muestran análisis de la expresión BPV1 L1 y L2 en células CV-1 infectadas con virus de vacuna recombinante y tipo salvaje; y

Las Figuras 15A y 15B muestran microscopia de electrón de cápsidos BPV1 que se obtienen a partir de células infectadas con virus de vacuna recombinante.

35 Ejemplo 1

VLPs derivados de HPV16

40 El gen HPV-16 L1, del segundo ATG (nt5637), se amplificó por medio de reacción en cadena de polimerasa de Phpv16 (proporcionado por Dr. L. Gissmann), empleando los siguientes cebos:

1/ 5'-CAGATCTATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCC-3'
2/ 5'-CAGATCTAATCAGCTTACGTTTTGCGTTAGC-3'

45 El primer codón de metionina y codón de parada se indican con subrayado, y los puntos *Bg*/II se incluyen para facilitar la subclonación. El fragmento 1527 bp amplificado se extrajo con fenol y se purificó por 1% electroforesis de gel de aragose. Tras la digestión con *Bg*/II el gen L1 fue subclonado al punto *Bam*HI del plásmido RK19 (Kent 1988 Ph. D. Thesis, University of Cambridge) que contiene un fuerte promotor de virus de vacuna (4b). El plásmido resultante fue secuenciado (Sanger *et al.*, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74,5463-5467) y se empleó para preparar un fragmento que contiene el gen HPV16 L1 unido al promotor 4b por digestión con *Mlu*I y *Sst*I. Este fragmento fue despuntado con polimerasa T4 ADN y se clonó en el punto *Bam*HI del vector intermedio de vacuna pLC1, que contiene el gen B24R de virus de vacuna (Kotwal and Moss, 1989, J. Virol. 63, 600-606; Smit *et al.*, 1989, J. Gen. Virol. 70, 2333-2343), un gen *E. coli ggt* (Falkner and Moss, 1988, J. Virol. 64, 1849-1854; Boyle and Coupar, 1988, Gene 65, 123-128) y múltiples puntos de clonación para producir plásmido pLC200.

50 El gen HPV16 L2 se preparó por medio de digestión parcial de Phpv16 con *Acc*I para producir un fragmento (4138nt-5668nt) que se llenó con Klenow y se unió a uniones sintéticas *Bam*HI. Este fragmento L2 se clonó al punto *Bam*HI de un plásmido derivado Puc de término Ip480 que tiene un promotor tardío de vacuna sintética 28k, con algunas modificaciones (Davison and Moss, 1989, J. Mol. Biol. 210, 771-784). La secuencia del promotor es la siguiente;

5' -GAGCTTTTTTTTTTTTTGGCATATAATGGAGGTACCC-3'

60 65 El motivo del promotor tardío está subrayado. Un fragmento que contiene el gen L2 unido al promotor 28K fue aislado por digestión con *Sst*I/*Sal*I, despuntado por polimerasa T4 ADN y después se clonó a puntos *Sst*I y *Sal*I de pLC200 para producir pLC201 (Fig. 1).

ES 2 267 890 T3

En la figura 1, HPV16 L1, L2 (cajas abiertas) están bajo control de los promotores tardíos de vacuna (cajas sólidas). El gen *E. coli* gpt (caja sombreada) se emplea como marcador de selección. Secuencia lateral para recombinación homóloga. La dirección de la transcripción está dirigida por flechas.

5 El plásmido pLC201 se empleó posteriormente para construir un virus de vacuna recombinante como se ha descrito previamente (Mackett *et al.*, 1984, J. Virol. 49, 857-864). El virus recombinante pLC201 W y PIc202W se seleccionaron por ensayo de placas en presencia de ácido micofenólico, xantina, e hipoxantina (Falkner and Moss, 1988). El virus de vacuna recombinante (W) que expresa HPV16L1, y HPV16L2, se prepararon y usaron como se ha descrito anteriormente (Zhou *et al.*, 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190).

10 El plásmido recombinante pLC201 se depositó en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 208502, U. S. A el 27 de marzo, 1992 y se le dio la designación 75226.

15 El virus de vacuna recombinante pLC201 Vv se depositó en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 208502, U. S. A el 3 de abril, 1992 y se le dio la designación VR2371.

Purificación de partículas similares a virus

20 Las células CV-1 infectadas con virus recombinante Plc201Vv se cultivaron en 10 mM Tris (pH 9.0) 32 horas después de la infección y se homogenizaron con un homogenizador Dounce. Los homogenizados fueron aclarados por centrifugación a 2000 g para retirar los restos y se hicieron capas al 30% (wt/vol) de amortiguador de sacarosa. La bola formada por centrifugación a 110,000 g en un rotor SW38 durante 90 minutos se suspendió en 10 mM Tris pH 9.0 y se hicieron capas en un 20-60% en gradiente de sacarosa discontinua. Tras la centrifugación a 100,000 g durante 18 horas, se recogieron 10 fracciones iguales de 0.25 ml. Las muestras se mezclaron con 0.6 ml de etanol.

25 25 Para determinar la densidad de las partículas similares a virus, el equilibrio densidad-gradiante sedimentación se llevó a cabo en CsCl (1.30 g/ml). Después de la centrifugación a 125,000 xg durante 20 horas, se recogieron 11 fracciones de 0.25 ml. Se determinó la densidad de cada fracción, y cada una de ellas se examinó para partículas similares a virus por microscopía de electrón de transmisión.

30 30 En la Figura 2A las células se infectaron a 10 pfu/célula con wt VV (ruta 1) y pLC201VV (ruta 2) y se cultivó a las 48 horas tras la infección. La proteína L1 se detectó con el específico HPV16L1 Mab Camvir 1. La proteína 57 kDa L1 se indica con una flecha. El enlace de Camvir 1 con la proteína 35 kDa es no-específica en las tres rutas.

35 35 En la Figura 3 ARNs extraídos de células infectadas con pLC201 W (ruta 2), pLC202VV (ruta 3) que también incorpora genes que codifican proteínas HPV16 E1 Y E4 así como genes que codifican HPV16 L1 y L2 o wt. VV (ruta 4) se descomponen en un 1.2% formaldehído-sacarosa gel. ARN fue transferido a membrana de nylón y se hibridizó con una prueba L2 etiquetada 32P. Se muestra lambda con tratamiento de formaldehído ADN-Hind III marcador de corte (ruta 1).

40 Microscopia de electrón

45 Células CV-1 infectadas con virus de vacuna recombinante fueron fijados en 3% (vol/vol) glutaraldehído en 0.1 M búfer cacodilato sódico y posteriormente fijado en 1% *osmium tetroxide*, deshidratado en alcohol de graduación, e insertado en resina epoxidica. Se cortaron finas secciones y se tintaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se secaron fracciones del gradiente de sacarosa en redes de EM, y se tintaron de manera negativa con 1% (wt/vol) ácido fosfotungstico (pH 7.0). Se examinaron fracciones utilizando un microscopio de electrón de transmisión JEOL 1200 Ex.

50 50 En la Figura 4A se muestra células CV-1 infectadas con PIc2201VV durante 32 horas. En los núcleos de CV-1, se encontraron con frecuencia partículas de aproximadamente 4-nm de diámetro (señaladas con una flecha). La barra corresponde a 100 nm.

55 En la Figura 4B se muestra la fracción 5 del gradiente de sacarosa. Se observaron partículas similares al virus de papiloma que aparentemente consistían en selecciones regulares de capsómeros (señalados con una flecha). La barra corresponde a 50 nm.

Análisis de productos HPV ORF

60 60 La expresión HPV16 L1 fue analizada por inmunoprecipitación e inmunoblot. Para la inmunoprecipitación, células CV-1 infectadas Vv recombinante metabólicamente etiquetadas fueron lisadas en búfer RIPA 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 1% deoxicolata de sodio 150 mM NaCl, 0.5 µg/ml aprotinina, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Análisis de inmunoblot de partículas similares a virus parcialmente purificadas, usando el específico L1 Mab Camviri (McLean *et al.*, 1990, J. Clin. Pathol. 43, 488-492) y antiratón 1251 IgG(Amersham), se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente empleando muestras que se solubilizaron en 2x SDS gel cargado de búfer que contiene 2-mercaptopetanol. El análisis de la expresión de gen HPV16 L2 se muestra en la Figura 13B. Para análisis de N-glicosilación, partículas similares a virus parcialmente purificadas se llevaron a 100 µl búfer/0.25 M acetato de sodio, pH 6.5, 20 mM EDTA y 10 Mm 2-mercaptopetanol) y reaccionó con 0.5 u Endoglicosidasa F (Boehringer Mannheim) a 37°C durante 18 horas antes de inmunoblot.

ES 2 267 890 T3

Se empleó ácido micofenólico para seleccionar un recombinante de virus de vacuna para el plásmido gpt pLC201 y esto se denominó pLC201VV. Síntesis de L1 en células infectadas con pLC201VV se confirmó mediante immunoblot e inmunoprecipitación. La proteína L1 se demostró como una banda en auto radiografía de aproximadamente 57 kDa. Un northern blot de ARN extraído de células CV-1 infectadas con estos virus recombinantes confirmaron la 5 existencia de niveles elevados de transcripción L2 mARN en células infectadas con cualquiera de estos virus (Fig. 3). La transcripción L2 de un promotor tardío sintético de virus de vacuna sintético dio un patrón de heterogéneo northern blot porque ARNs tardías VV no usan una señal específica de fin de transmisión.

Las células CV-1 fueron infectadas con pLC201VV y se examinaron para partículas similares a virus. Micrografías 10 de electrón de finas secciones de células infectadas con pLC201VV, pero no de células de control infectadas solamente con vacuna de tipo salvaje, mostraron aproximadamente 40 nM de partículas similares a virus en núcleos celulares. En la mayoría de los casos estas partículas estaban unidas en cadenas, y cerca de la membrana nuclear (Fig. 4a). Las células infectadas con virus de vacuna recombinante que expresaron sólo HPV16 L1 o sólo L2, y produjeron la correspondiente proteína L1 o mARN (L2), no contenían partículas similares a los virus. Las células simultáneamente 15 infectadas con dos virus diferentes de vacunas recombinantes, que expresaron HPV16 L1 y HPV16 L2 respectivamente, también fallaron para producir partículas similares a los virus; aunque la proteína L1 y L2 m RNA pudieron identificarse en pozos de estas células doblemente infectadas no se demostró la síntesis simultánea de L1 y L2 dentro de células individuales.

En la Figura 5 partículas similares a virus HPV16 obtenidas a partir de células CV-1 infectadas con pLC201VV 20 se centrifugaron sobre un amortiguador de sacarosa y posteriormente se sometieron a sedimentación isopynic CsCl. Se encontraron partículas similares a virus (+) en fracciones 8 y 9. La micrografía de electrón de transmisión de una partícula tintada negativamente de fracción 8 se muestra en el encarte. Se indica la densidad (g/ml) de cada fracción de gradiente.

En la Figura 6, células CV-1 fueron infectadas con pLC201VV durante 32 horas, y las partículas similares a virus 25 fueron purificadas en un gradiente de sacarosa. Las muestras fueron precipitadas con etanol y se trataron con endoglicosidasa F antes del análisis de immunoblot con un anticuerpo anti-HPV16 L1 Camvir I. Ruta 1: partículas similares a virus purificadas. Ruta 2 y 3: después del tratamiento con endoglicosidasa F durante la noche. El doblete L1 se indica con (=), y endoglicosidasa L1 se indica con la flecha. Los marcadores de peso molecular se muestran a la 30 izquierda.

Para confirmar que las partículas similares a virus observadas por la micrografía de electrón contenían proteína 35 HPV16 L1, extractos de célula de células infectadas pLC201VV se sometieron a una purificación parcial en un 20&-60% gradiente de sacarosa. Se recogieron y examinaron diez fracciones para proteína L1. De las fracciones 3 a la 7 se detectó L1 y en la fracción 5 se encontró el nivel más alto de L1. Cada fracción fue también examinada por EM para partículas similares a virus: éstas se observaron en la fracción 5. Un virus típico de papiloma negativamente tintado con fosfotungstato de sodio, tiene 72 capsómeros regulares y cerrados (Finch and Klug, 1965, J. Mol. Biol. 13, 1-12; Rowson and Mahy, 1967, Bacterial. Rev. 31, 110-131) y tiene un diámetro de aproximadamente 50 nm. 40 El diámetro de las partículas similares a los virus purificadas de las células CV-1 infectadas varió entre 35 nm y 40 nm. Sin embargo, estas partículas similares a virus tenían una apariencia EM similar a los virus del papiloma, y se reconoció una selección regular de capsómeros (Fig. 4b). Se asumió que las partículas similares a virus identificadas en la fracción 5 del gradiente de sacarosa estaban vacías e incorrectamente reunían capsómeros HPV. En CsCl, partículas de virus HPV16 sedimentadas a aproximadamente 1.31 g/ml (Fig. 5), mostraron una apariencia típica de cápsido de 45 virus de papiloma vacío bajo el electro microscopio de transmisión (Fig. 5, encart).

Camvir-1 identificó un doblete de proteína en western blots de partículas similares a virus purificadas de células CV-1 infectadas de pLC201 W (Fig. 6). HPV16 L1 contiene cuatro puntos de potencial N-glicosilación (asparagina 50 157, 242, 367 y 421). Para probar si el doblete representaba variantes de glicosilación del polipéptido L1, las partículas similares a virus parcialmente purificadas fueron sometidas a tratamiento con endoglicosidasa F, antes de SDS-PAGE e 55 immunoblot. Esto resultó en la sustitución del doblete por una simple banda de aparente peso molecular ligeramente bajo, en el peso molecular esperado de aproximadamente 57 kDa (Fig. 6, ruta 2, 3).

Las partículas similares a virus recogidas de las fracciones del gradiente CsCl con una densidad boyante de 1.29- 55 1.30 g/ml se emplearon como antígeno en una técnica ELISA. Todos los antisueros de ratones inmunizados con VLPs fueron positivos. (Tabla 2). El suero de control de ratones inmunizados con fracciones similares de un gradiente de densidad preparado con Usado de células CV-1 infectadas con vacuna de tipo salvaje no fueron activas con las partículas similares a virus. Mediante el uso de dos protocolos diferentes para cubrir las partículas similares a virus en placas ELISA (Dillner *et al.*, 1991, J. Virol. 65, 6862-6871), se realizaron intentos para distinguir reactividad con 60 partículas similares a virus HPV nativos de reactividad con proteínas parcialmente desnaturadas de partículas afectadas. Los antisuero de murina que ascendieron contra los VLPs fueron igualmente reactivos con las partículas nativas (OD 1.00±0.20) y desnaturadas (OD 1.60±0.45). Un panel de seis anticuerpos específicos monoclonales para los epítopes definidos L1 incluyeron solamente 1 (Camvir 1) que fue débilmente reactivo (OD 0.064) con VLPs nativos, y se probó que hubo más reactividad con partículas desnaturadas (OD 0.107) que con partículas nativas, 65 lo que sugiere que la reactividad se dio con proteína L1 desnaturizada en la preparación VLP nativa.

En la Figura 8 el anti-ratón IgG etiquetado ¹²⁵I se usó como segundo anticuerpo. La banda L1 57-kDa está indicada con una flecha. Explicación: suero de ratones individuales inmunizados con VLPs: rutas 1-5, BALB/c; rutas 6-10,

ES 2 267 890 T3

C57B1/6; rutas 11-15, B10A; suero de ratones individuales inmunizados con CFA; ruta 16, BALB/c; ruta 17, C57B1/6; ruta 18, B10A; anti-HPV 16L1 Mab Camvir 1, ruta 19. Los pesos moleculares se indican a la izquierda.

La reactividad de los antisuero anti-VLP con proteínas L1 y L2 de HPV16 se confirmó por inmunoblot utilizando 5 proteínas L1 y L2 recombinantes de baculovirus. Los sueros de todos los ratones inmunizados con partículas similares a virus, y cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-HPV16 L1, reconocieron una proteína 57-kDa (Fig. 8) en los lisados de célula *S. frugiperda* infectada de baculovirus recombinante L1, y no se observó reactividad comparable con lisados de células *S. frugiperda* infectadas con baculovirus de tipo salvaje. La intensidad de reactividad con la proteína 10 L1 varió de ratón a ratón, pero todos los sueros fueron reactivos con exposición prolongada de los inmunoblot. Se obtuvieron similares resultados con lisados de células infectadas de baculovirus recombinante: antisuero murina anti- 15 VLP y un antisuero de conejo con proteína L2 reaccionaron ambos con una proteína sencilla en el lisado. El suero de ratones inmunizados solamente con CFA falló al reaccionar con proteína de lisados de L1 y L2 *S. frugiperda* infectada de baculovirus recombinante.

15 Ejemplo 2

Definición de regiones antigenicas lineares de HPV16L1

Proteína que usa VLPS

20 En una posterior serie de experimentos se determinaron las regiones lineares antigenicas de la proteína cápsido HPV16 L1 que usa VLPS sintético. En tales experimentos ratones de tres haplotipos (H-2^d, H-2^b, y H-2^{d/b}) fueron inmunizados con partículas similares a virus de HPV16 sintético (VLPS) que se producen usando un virus de vacuna doblemente recombinante para las proteínas L1 y L2 de HPV16. Los antisuero resultantes anti-VLP reconocieron 25 cápsidos HPV16 por medio de la técnica ELISA y HPV16L1 recombinante de baculovirus y proteína L2 en inmunoblot. Se emplearon los péptidos superpuestos que corresponden a la secuencia de aminoácido de HPV16L1 para definir las regiones inmunoreactivas de la proteína L1. La mayoría de péptidos L1 fueron reactivos con IgG de ratones inmunizados con los cápsidos sintéticos HPV16. Un algoritmo computerizado predijo siete epítopes B en HPV16 L1, 30 cinco de los cuales estaban dentro de péptidos fuertemente reactivos con los antisuero de murina. Los antisuero de murina anti-VLP fallaron al reaccionar con los dos péptidos reconocidos por anticuerpos monoclonales anti-HPV16L1 que ascendieron por otro contra la proteína de fusión L1 recombinante. Se concluye que los epítopes inmunoreactivos de HPV16 definidos que usan partículas similares a virus difieren considerablemente de aquellos definidos que usan HPV16L1 recombinante, proteínas de fusión, lo que implica que tales proteínas de fusión pueden no ser antígenos que buscan respuestas inmunes específicas HPV16L1 en pacientes infectados de HPV.

35 *Producción de cápsidos HPV16*

Plásmido que contiene marcos de lectura abiertos (ORFs) pLC201 que contiene HPV16L1 y L2 bajo el control 40 de promotores de virus de vacuna 4b (natural) y p480 (sintético) fue empleado para reconstruir el virus de vacuna recombinante (rVV) células CV-1 infectadas de pLC201 VV como se ha mencionado previamente, pero las células 45 no se cultivaron en un medio que contiene rifampicina a 100 µg/ml para prevenir la formación y maduración del virus de vacuna (Moss, "Virology" p685-703 Raven, New York, 1985; Karacostas *et al.*, PNAS 86, 8964-8967, 1989). Las células infectadas fueron cultivadas y lisadas mediante procesos de congelación y descongelación seguidos de homogenización Dounce en 10 mM Tris-HCl (pH 9.0). Los lisados se aclaron por centrifugación a 2000 g y después 50 giraron a 100,000 g durante 2 horas sobre un 20% amortiguador de sacarosa en báfer PBS. La bola fue mezclada con CsCl a una densidad inicial de 1.30 g/ml y se centrifugó a 100,000 g durante 18 horas a 18°. Se recogieron las fracciones y los inmunoblot se llevaron a cabo en proteínas precipitadas de etanol. Las fracciones que resultaron positivas para proteína L1 se acumularon, y la presencia de partículas similares a virus fue confirmada mediante microscopía de electrón como se ha descrito anteriormente.

55 *Producción de antisuero*

Grupos de cinco ratones BALB/c (H-2^d), C57B1/6 (H-2^b), y B10A (H-2^{d/b}) se inmunizaron con partículas similares a virus HPV16 purificadas de gradiente CsCl. Los animales fueron inoculados con 5 µg de proteína cápsida mediante inyección subcutánea. La inyección inicial fue administrada con adyuvante completo de Freund, y se administraron tres inyecciones posteriores en salina en intervalos de tres semanas. Catorce días después de la primera inyección, se recogieron los sueros y se almacenaron a -20°. Se empleó material procesado de células CV-1 infectadas con virus de vacuna de tipo salvaje con el fin de inmunizar grupos de control de ratones de acuerdo con el mismo protocolo.

60 *Péptidos*

Una serie de péptidos 15-mer que se sobreponen por cinco residuos, y que abarca la secuencia de aminoácido deducida de proteína HPV16L1 (Seedorf *et al.*, 1985, Virology 145 181-185; Parton, 1990, Nucleic Acids Res 18 65 363) fue sintetizada con el sistema de síntesis de péptido múltiple DuPont RaMPS usando química Fmoc de acuerdo con los protocolos estándar (Fields and Noble, 1990 Int. J. Pept. Protein Res 35 161-214) y después se conjuguó con glutaraldehído para albúmina de suero bovino (BSA). Para denotar la posición de los aminoácidos (aas9 en la proteína L1, el primer codón de iniciación putativo fue designado aminoácido número 1 (Tabla 1). Por razones técnicas, el

ES 2 267 890 T3

péptido C-terminal que corresponde a 521-531 no se utilizó. Todos los péptidos usados fueron de pureza mayor a 85% según los resultados del análisis de HPLC.

5 *Proteínas recombinantes L1 + L2*

Los baculovirus recombinantes que expresan HPV16L1 o HPV16L2 ORF se utilizaron para infectar células de insecto SF9. Despues de 3 días de incubación a 25°, las células se transformaron en bolas por medio de búfer de centrifugación a 14,000 g durante 5 minutos. La bola fue disuelta en búfer RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 2 mM EDTA; 50 mM NaCl; 1% deoxicolata; 1% Triton X-100; 0.25% SDS; 1% aprotinina; 1 mm PMSF).

10 *Western Blot*

Las partículas similares a virus o proteínas L1 o L2 recombinantes se mezclaron con 2X con búfer que contiene 2% SDSIDTT y se hirvió durante 5 minutos. Las proteínas se separaron en 10% geles poliacrilamida y se secaron en nitrocelulosa (Towbin *et al.*, 1979, *Virology* 175 1-9). Los filtron se cortaron en tiras, se incubaron en 3% BSA en PBS a 37° durante 1 hora. Tiras bloqueadas se expusieron a los varios antisuero de murina (1:200) o anticuerpos monoclonales durante la noche a 4°. Las proteínas reactivas se visualizaron por auto radiografía tras la reacción con anti-ratón ¹²⁵I-conjugado (0.2 µCi/ml) (Amersham).

20 *Técnica ELISA*

Los antisuero monoclonales fueron testados para reactividad con cápsidos HPV16 sintéticos por un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) como se ha descrito anteriormente (Christensen *et al.*, 1990, *PNAS* 76 4350-4354, Cowser *et al.*, 1987, *JNCI* 79 1053-1057). Para ensayos con cápsidos HPV16 "nativos", se añadieron 100 nm de proteína en PBS (Ph 7.5) a cada pozo de placa ELISA (Flow Label) por incubación durante 1 hora a 37°. Para ensayos con partículas "desnaturalizadas", las partículas fueron suspendidas en búfer carbonato, pH. 9.6, y se adsorbió a la placa durante toda la noche a 37°. Todas las posteriores incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS, y los puntos independientes fueron bloqueados por incubación durante 1 hora en búfer de bloqueo (5% polvo de leche en PBS, pH 7.5). Los antisuero de murina (1:200), previamente adsorbidos con extracto de célula CV-1 infectada con tipo salvaje VV, se añadieron y se incubaron durante 1 hora, y las placas se lavaron con PBS. Anti-ratón IgG conjugado peroxidasa rábano de caballo (Sigma) a dilución 1:1000 en búfer de bloqueo fue añadido y se incubó durante 1 hora, seguido de 10 lavados con PBS. Se añadió búfer de substrato (pH 4.6) que contiene ABTS (Boheringer) y H₂O₂ y read OD415 después de 15 minutos.

35 *Encuadre de epítope Lineal B*

Los epítopes B se identificaron analizando los antisuero de animales inmunizados contra el conjunto de péptidos superpuestos HPV16L1 por ELISA. Los péptidos sintéticos enganchados a BSA se diluyeron en 10 nM búfer carbonato sódico (pH 9.3) y se adsorbió a placas ELISA durante la noche a 4°. El bloqueo de puntos de enlace residuales en las placas se llevó a cabo usando 3% BSA en PBS durante 2 horas a 37°. Los antisuero de ratón diluidos (1:500) se incubaron con placas cubiertas a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron con PBS que contienen Tween 20 (0.1%) y se incubó con antiratón IgG conjugado de peroxidasa (1:1000) (Sigma) durante 2 horas. Las placas se lavaron y desarrollaron con 0.5 mg/ml ABTS en búfer sustrato (pH 4.6) durante 15 minutos antes de grabar los valores de absorción a 415 nm. Se consideró que un péptido era reactivo si el valor OD 415 en el test de suero era mayor que 3 SDs por encima de la media para el suero de control: esto dio un valor aislado de 0.260. Un OD 415 de cinco veces la media OD 415 obtenida con suero de control (0.55) fue arbitrariamente considerado para definir un epítope más reactivo.

50 *Anticuerpos monoclonales y antisuero*

Se utilizaron cinco anticuerpos monoclonales (MAb) elevados contra proteína de fusión HPV16L1. Se aportaron MAb 5A4, ID6, 3D1, Y 8C4 (Cason *et al.*, 1989, *J. Gen Virol* 70 2973-2897) por el Dr. Phil Shepherd de Londres, U. K y MAb Cambir 1 (McLean *et al.*, 1990, *J. Clin. Pathol.* 43 488-492) se obtuvo del Dr. C. McLean (Department of Pathology, University of Cambridge). El antisuero de conejo con proteína de fusión HPV16 L2-Trp-E fue proporcionado por Dr. Dense Galloway (University of Washington, Seattle).

55 *Análisis de secuencia de aminoácido y predicción de índice antigenético*

El índice antigenético (A1) (Jameson and Wolf, 1988, *Comp. Appl., Biosci.* 4 181-186) es una medida de probabilidad de que una secuencia de péptido sea antigenética. Se calcula sumando varias medidas pesadas de estructura secundaria. Los valores para la secuencia pronosticada HPV16L1 se calcularon usando software PLOTSTRUCTURE.

En las Figuras 9 y 10, se muestra la reactividad (OD 415) de los sueros en ELISA con una serie de péptidos superpuestos correspondientes a la secuencia de HPV16 L1. Se indican el número de péptidos correspondientes a la secuencia HPV16L1 (ver Tabla 1).

En las Figuras 11 y 11A, el sistema de numeración para los aminoácidos corresponde a HPV16L1 a partir del primer codón de iniciación putativo. Se indican las regiones con valor A1 sobre 1.5.

En la Figura 12, se muestran las regiones de HPV16L1 dentro de las cuales epítopes B han aparecido en un rango de sistemas de encuadre. Los resultados de los sueros de ratones inmunizados con los VLPs (Partículas) y con anticuerpos IgA e IgG en sueros de humanos con cáncer cervical (IgA Humano e IgG Humano) (Dillner *et al.*, 1990 Int. J. Cancer 45 529-535) se obtuvieron utilizando péptidos superpuestos. Los antisueros anti VILP de murina resultaron ser considerablemente reactivos con un péptido si el OD era mayor que 0.55. Los resultados de ratones inmunizados con una proteína de fusión L1 (Suero de Conejo) (Muller *et al.*, 1990 J. Gen Virol 71 2709-2717) se señalan: estos fueron determinados usando una serie de expresiones de longitud parcial y se muestra toda la longitud de la secuencia dentro de la cual el/los epítope(s) yacen. También se indican los epítopes B pronosticados por algoritmos (Computer) (Jameson and Wolf Comp. Appl. Biosci 4 181-1861988) y los epítopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales anti-HPV16L1 publicados (Monoclonales) (Cason *et al.*, J. Gen Virol. 70 2973-2987 1989; McLean *et al.*, J. Clin Pathol. 43 488-492 1990). La escala muestra la posición de los epítopes a lo largo de la proteína 531 aa L1, y está numerada a partir de N-terminal metionina (residuo 1). Para cada epitope que contiene péptido, también se da la posición exacta con respecto a la N-terminal metionina.

Una serie de péptidos sintéticos 15-mer de la proteína HPV16 L1, que cubre toda la longitud de la proteína con cinco superposiciones a, fue utilizada para definir los epítopes en L1 reconocidos por varios sueros inmunes. Cada uno de los 16 antisueros de las tres razas de ratones endogámicos testados, BALB/C (H-2^d), C57B1/6 (H-2^b), y B10A (H-2^{b/d}), reconocieron múltiples péptidos lineales de la proteína L1, y básicamente se reconocieron los mismo péptidos de HPV16 L1 por todas las razas testadas (Fig. 10). Se examinaron cinco sueros individuales de cada raza. Se diseñó un péptido reactivo si el OD con un suero era mayor que la media + 3SD de los ODs del suero de control negativo; esto significó un límite para la reactividad de 0.260. Los sueros de ratones inmunizados sólo con CFA tenían una reactividad OD 415 de menos de 0.260 con todos los péptidos L1. Mientras se observaron algunas variaciones en la intensidad de la reactividad de cada suero anti-VLP de una raza dada de cada péptido, cada uno de los péptidos fue reactivo (OD > 0.260) con cualquiera o ninguno de los sueros anti-VLP de cada raza de ratones. El isotipo del anticuerpo específico de péptido en el suero anti-VLP se examinó empleando anticuerpos IgG e IgA específicos anti-ratón inmunoglobulina. La respuesta de IgG fue como se mostró (Figs. 9 y 10) y no se detectó reactividad IgA significante para ningún péptido (OD < 0.050). Debido a que la mayoría de los péptidos fueron reactivos con los sueros anti-VLP se empleó un valor arbitrario OD de cinco veces el promedio negativo para definir las regiones de mayor reactividad de la proteína L1: los péptidos L1 con mayor reactividad fueron distribuidos a lo largo de la longitud de la proteína L1, siete se situaron en la tercera amino terminal de la molécula, siete en la tercera mitad, y ocho en la tercera carboxi-terminal. En cambio, los anticuerpos monoclonales específicos para HPVI6 L1 reconocieron sencillos epítopes lineales mayores como se ha descrito anteriormente (Cason *et al.*, arriba, McLean *et al.*, 1990, arriba). Cuatro de los cinco anticuerpos monoclonales reactivos anti-HPV16 L1 (5A4, 1D6, 3D1, 8C4) fueron reactivos con péptido 30 (291-305), mientras que Camvir 1 reconoció péptido 24 (231- 245) (Figs. 11 y 11A). Sueros de ratones inmunizados con partículas similares a virus fallaron al reaccionar con cualquiera de estos péptidos.

Se usó un algoritmo para deducir posibles epítopes B de HPV16L1, basado en la estructura secundario. Se calcularon posibles regiones antigenicas como un índice antigenico (A1)(Jameson and Wolf, 1988, arriba) en la base de flexibilidad en cadena, elevada accesibilidad y elevado grado de hidrofilicidad (Fig. 11). Se consideró una región con un valor A1 superior a 1.5 como un epítope B pronosticado. Se encontraron las mencionadas siete regiones (aminoácidos 79-84, 105-108, 120-122, 134-135, 267- 269, 298-299, 363-367) y cinco de estas siete regiones estaban dentro de los 22 péptidos en los que se reconoció mayor reactividad con antisueros de ratones inmunizados con cápsidos HPV16 sintéticos. El resumen de la particularidad de epítope B de antisueros de diferentes fuentes se muestra en la Fig. 12.

En consideraciones posteriores de Ejemplos 1-2 se muestra que los virus de papiloma generalmente producen viriones en queratinocitos infectados que son fácilmente identificables por microscopia de electrón (Almeida *et al.*, 1962, J. Invest. Dermatol 38, 337-345) y que en algunos casos pueden purificarse y resultar infecciosos (Rowson and Mahy, 1967, Bacterial. Reo. 31,110-131). Sin embargo, viriones HPV16 no se observan en tejido epitelial cervical infectado de HPV16 a pesar de que la transcripción de gen tardío HPV16 L1 y L2 ocurre en epitelio genital diferenciado (Crum *et al.*, 1988. J. Virol. 62, 84-90) y la translación L1 produce proteína L1 inmunoreactiva en estos tejidos (Stanley *et al.*, 1989, Int. J. Cancer 43, 672-676). En esta descripción hemos demostrado que la expresión de genes HPV16 L1 y L2 en células epiteliales es necesaria y suficiente para permitir la formación de partículas similares a viriones HPV16 y por lo tanto las proteínas L1 y L2 de HPV16 no son defectuosas en relación con la formación de viriones. La expresión de genes tardíos HPV16 en tejidos parece estar estrictamente regulada por el medio epitelial (Taichman *et al.*, 1983, J. Invest. Dermatol 1, 137-140). El error al detectar viriones HPV16 *in vivo*, a pesar de la transcripción de L1 y L2 y de la translación de L1, sugiere que no hay un bloqueo de puesto trascipcional a la producción de L2 en epitelio cervical, o un inhibidor de formación de viriones. En el HPV16 que contiene línea celular W12, derivado de tejido cervical se observaron partículas similares a virus cuando las células sufrieron diferenciación terminal *in vivo* en un microambiente de murina (Sterling *et al* 1990. J. Virol 64, 6305-6307) sugiriendo que tales células no bloquean la formación de viriones, y que la translación insuficiente de L2 u otras razones desconocidas podrían explicar el error para demostrar viriones HPV16 en tejidos cervicales.

Nuestros estudios EM muestran que el virión HPV16 vacío tiene un tamaño medio de 40 nm que es menor que otros virus de papiloma, pero tiene una estructura superficial similar a otros virus de papiloma como por ejemplo el virus de papiloma de conejo (Finch and Klug, 1965 J. Mol. Biol 13 1-12), o virus de verruga humana (Rowson and Mahy 1967 anteriormente citado). La sedimentación mostró una densidad de cápsido vacío de aproximadamente 1.31 g/ml, la densidad esperada de cápsidos de virus de papiloma vacíos en comparación con aproximadamente 1.36 g/ml para viriones HPV16 intactos (Doorbar and Gallimore, 1987, J. Virol. 61, 2793-2799).

ES 2 267 890 T3

La proteína L1 de HPV tiene puntos de glicosilación potencial, y partículas BPV purificadas tienen formas electroforéticas menores de L1 cuya movilidad es sensible al tratamiento de endoglicosidasa (Larsen *et al.*, 1987, J. Virol. 61, 3596-3601). Se ha observado que L2 de HPV 18 y HPV 11 son un doblete (Rose *et al.*, 1990, J. Gen. Virol. 71, 2725-2729); Doorbar and Gallimore, 1987; Jin *et al.*, 1989, J. Gen. Virol. 70, 1133-1140) y este hecho ha sido atribuido a las diferencias en glicosilación. Nuestros datos demuestran que la proteína L1 en capsómeros HPV16 es también glicosilado, y que existen dos diferentes estados de glicosilación.

En esta descripción empleamos partículas similares a virus sintéticas para estudiar inmunogenicidad de las proteínas cápsidas HPV16 producidas en un sistema eucariótico. Se utilizaron proteínas cápsidas producidas en células eucarióticas debido a que las proteínas cápsidas de virus de papiloma producidas en células eucarióticas sufren modificación post-traslacional (Browne *et al.*, 1988 J. Gen. Virol. 69 1263-1273; Zhou *et al.*, 1991 Virology 185 625-632) que puede ser un determinante importante de presentación de antígeno. Se seleccionó un vector de expresión de vacuna recombinante debido a que las partículas HPV16 no nativas no están disponibles en lesiones clínicas, o en propagación viral en cultivo celular. Utilizamos el HPV16 VLPs para producir antisueros policlonales anti-VLP en ratones, estos sueros reaccionaron fuertemente con los cápsidos HPV16 por medio de ELISA. Hemos demostrado a través de inmunoblot que los antisueros anti-VLP reconocieron epítopes en L1 desnaturalizada (Fig. 2) y L2. Además, los sueros anti-VLP definieron 22 péptidos mayores reactivos en una serie de 5515-mer péptidos de L1. Estos datos indican que los antisueros elevados contra partículas virales con frecuencia reconocen determinantes lineales. El perfil de reactividad humoral con el conjunto de péptidos L1 fue casi idéntico en las dos razas distintas de ratón MHC, lo que sugiere que hay suficientes epítopes T en L1 y que la restricción MHC no se limita a determinar la respuesta humoral en la proteína HPV16 L1 en las razas de ratón aquí examinadas.

Los datos para particularidad epítope B obtenidos con nuestros antisueros de murina anti-VLP pueden compararse (Fig. 12) con un estudio similar de suero "inmune" de mujeres con displasia cervical (Dillner *et al.*, 1990 Int. J. Cancer 45 529-535). Se reconocieron varios péptidos por suero humano inmune y por antisuero anti-VLP, pero la mayoría de péptidos reactivos con el antisuero murina anti-VLP no fueron reactivos con el suero humano inmune (Fig. 12). Ninguna de las regiones de L1 (221-235, 291-305) reconocidas por anticuerpos monoclonales específicos L1 (Cason *et al.*, 1989; McLean *et al.*, 1990) fueron reconocidas por nuestros antisueros de murina anti-VLP. Debido a que se utilizaron proteínas de fusión L1 para ascender estos MAbs, y también se han utilizado para examinar anticuerpos en L1 en suero humano, la falta de reactividad de suero humano con proteína de fusión L1 (Jenison *et al.*, 1990, J. Infect. Dis 162 60-69; Köchel *et al.*, 1991 Int. J. Cancer 48 682-688) puede explicarse por el fallo de las proteínas de fusión L1 para representar los epítopes de L1 que están presentes en el sistema inmunológico humano por proteína nativa L1.

Examen de anticuerpos en proteína L1 con péptidos sólo detecta epítopes lineales

En un intento para determinar si la reactividad en los sueros de murina estaba dirigida contra los determinantes lineales y conformacionales, llevamos a cabo ensayos ELISA con las partículas tratadas de dos formas; una para preservar las partículas nativas y otra para producir proteína desnaturalizada (Dillner *et al.*, 1991 J. Virol. 65 6862-6871). No encontramos ningún suero o anticuerpo monoclonal reactivo exclusivamente con partículas tratadas en una u otra manera, aunque un MAB (Camvir 1) reaccionó más fuertemente con las partículas desnaturalizadas que con las "nativas". La falta de reactividad de la mayoría de los MAbs con las partículas desnaturalizadas sugiere que éstas estaban solamente parcialmente desnaturalizadas, ya que los mismos anticuerpos reaccionaron con proteína desnaturalizada en Western Blot. Por el contrario, la reactividad de Camvir 1 con las partículas nativas no es una prueba de que el epítope lineal reconocido por este anticuerpo pueda reconocer proteína L1 desnaturalizada presente en alguna cantidad en la preparación de partículas nativas y no tenemos pruebas de que VLPs intactos están conservados bajo nuestras condiciones ELISA.

Debido a que la mayoría de los anticuerpos reconocen determinantes de conformación dependientes (Benjamin *et al.*, 1984 Ann. Rev. Immunol. 2, 67-101), que pueden implicar varias secuencias de péptidos no contiguos (Amit *et al.*, 1986 Science 233 747-753), anticuerpos provocados para viriones tienen pocas posibilidades de reconocer proteínas fusionadas o desnaturalizadas así como proteínas nativas, como se ha demostrado para HPV1 antisuero (Steele and Gallimore, 1990 Virology 174 388-398). Viriones de algunas HPV asociadas a verrugas cutáneas están disponibles en suficientes cantidades como para ensayos de suero (Almeida and Goffe, 1965 Lancet 2 1205-1207; Kienzler *et al.*, 1983 Br. J. Dermatol. 108 665-672; Pfister and Zur Hausn, 1978 Int. J. Cancer 21 161-165; Pyrhonen *et al.*, 1980 Br. J. Dermatol. 102 247- 254; Pass and Maizal, 1973 J. Invest. Dermatol. 60 307-311) para hormonas de verrugas. La prevalencia de anticuerpos para viriones purificados en suero humano inmune varía de 20 (Genner, 1971 Acta Derm. Venereol (Stockh) 51 365-373) a 88% (Morison, 1975 Br. J. Dermatol. 93 545-552) dependiendo del sistema de detección que se emplee. Sin embargo, hasta hace poco, los viriones de tipos HPV genitales no han estado disponibles para estudios relacionados con el suero. El sistema de xerografía de ratones desnudos (Kreider *et al.*, 1987 J. Virol. 61 590-593) ha permitido la producción de partículas HPV11 para la detección de anticuerpos humanos (Bonnez *et al.*, 1991 J. Virol. 72 1343-1347). Anticipamos que los VLPs HPV16 aquí descritos permitirán estudios similares de reactividad de suero con partículas HPV16 nativas que iban a desarrollarse, y la falta observada de reactividad en suero humano con proteínas de fusión HPV15L1 (Jenison *et al.*, 1991 J. Virol. 65 1208-1218; Köchel *et al.*, 1991 ya mencionado) puede simplemente ser paralela con las observaciones similares con HPV (Steele and Gallimore, 1991 Virology 174 388-398).

Anticuerpos para proteínas estructurales BPV tienen actividad neutralizadora de virus (Pilacinski *et al.*, 1986 Ciba Found. Symp. 120 136-156) y antisueros elevados contra viriones HPV11 purificados también podían neutralizar

ES 2 267 890 T3

HPV11 infecciosos en un sistema de xerografía en ratones atípicos (Christensen and Kreider, 1990 J. Virol 64 3151-3156). Nuestros resultados indicaron que los cápsidos HPV16 sintéticos purificados son inmunogénicos y podían usarse para producir y evaluar anticuerpos neutralizadores del virus específicos para este virus oncogénico. La proteína BPV1 L1 expresada en *Escherichia coli* y las partículas BPV han protegido al ganado del desarrollo de verrugas 5 (Pilacinski *et al.*, 1986; Jarrete *et al.*, 1990 Vet. REc. 126 449-452). Una respuesta inmune similar a las partículas similares a virus HPV16 podría ser la base de una vacuna potencial para prevenir cáncer cervical asociado a HPV16.

En la Figura 13A, tras la infección con pLC201 VV, los lisados celulares CV1 fueron sometidos a sedimentación gradiente de equilibrio. Las partículas similares a virus purificadas se examinaron por microscopía de electrón de 10 transmisión después de la tinción negativa con ácido fosfotungstico. [barra = 100 nm].

En la Figura 13B, Ruta 1, el lisado de células CV1 infectadas con virus de tipo salvaje; ruta 2, lisado de L1 y 15 L2 que expresa el virus pLC201 VV; ruta 3, partículas similares a virus purificadas. Se probó la proteína L2 con un conejo anti HPV16 L2 anticuerpo seguido por ¹²⁵I-proteína A. Los pesos moleculares están indicados a la izquierda y las bandas de L2 están señaladas con flechas.

También se hace referencia a las Figuras 13A y 13B que muestran que HPV16 L1 y L2 doble recombinante VV 20 contienen proteína L2 como se ha demostrado por western blot, usando VLPs purificados y un antisero de conejo elevado contra proteína L2 recombinante VV.

Ejemplo 3

BPV1 VLPs

25 También se ha demostrado que los viriones del virus de papiloma bovino (BPV) 1 similarmente producido *in vitro* usando recombinante VV para las proteínas cápsidas BPV1 puede contener BPV1 ADN. Viriones completos son capaces de infectar una línea celular de fibroblasta permisible de ratón, como se indica por transcripción del marco de lectura abierto viral E1, y la infección se inhibe por incubación de viriones con anticuerpos a la proteína cápsida de 30 BPV1. A diferencia de las observaciones copara HPV16, las partículas similares a virus se forman en células infectadas con recombinante VV para la proteína cápsida BPV1 L1 solamente, pero la proteína L2 se necesita para el paquete BPV1 ADN para producir viriones infecciosos.

Haciendo referencia a los VLPs HPV16 mencionados anteriormente, estas partículas parecían consistir en capsómeros típicos de aquellos vistos en partículas HPV1 y BPV1 purificadas de lesiones clínicas (Bakar *et al.*, J. C. 35 Biphys J 60 1445-1456 1991, Staquet *et al.*, J. Dermatológica 162 213-219, 1981), aunque la morfología general de las partículas HPV16 fue bastante diferente a las partículas que se dan de manera natural HPV1 y BPV1. Como los 40 viriones naturales HPV16 no se han purificado de lesiones clínicas, se consideró apropiado distinguir y asegurar si esta diferencia morfológica era una propiedad de HPV16, o si el sistema de virus de vacuna recombinante (rVV) solía producir los viriones. Por consiguiente, se realizaron una serie de VVs, cada uno doblemente recombinante para las 45 proteínas de cápsido L1 y L2 de HPV16, HPV11, y de BPV1. La infección de células CV-1 con cada una de estas dobles VVs recombinantes produjo partículas del aspecto de virus, y éstas se parecían en gran medida a los auténticos viriones HPV1 y BPV1, mucho más que las partículas HPV16. Optamos por estudiar las partículas BPV-1, ya que las partículas naturales BPV-1 están mejor caracterizadas morfológicamente e inmunológicamente (Che *et al.*, Baker *et al.*, 1991, Cowser *et al.*, J. Natl Cancer Inst. 79 1053-1057) y las células lineales están disponibles que son permisivas para la reproducción episomal de ADN BPV-1 (Law *et al.*, 1981 DNAS 78 2727-2731).

En la Figura 13C, BPV1 L1 se expresa a partir de promotor tardío natural de vacuna p4b y L2 a partir de promotor tardío sintético de vacuna p480. El gen *E.coli* gpt se usa como un marcador de selección. Secuencias flanqueantes son el gen B24R de vacuna, lo que proporcionan una secuencia de vacuna para recombinación homóloga. Los genes BPV1 L1 y L2 se clonaron por PCR de plásmido pml-1. Debido a que el genoma BPV1 está alineado y clonado en el 55 plásmido a un punto BamHI en el BPV1 L2 ORF, el genoma se aisló en primer lugar de pml-1 por digestión BamHI y se recircularizó, y el BPV-1 ADN circularizado fue empleado como la plantilla PCR. Los cebos oligonucleótidos empleados para la amplificación L1 fueron:

5' - CGGGATCCATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAACAGCTG
5' - CGGGATCCTTATTTCCTTTTTGCAGGCTACTGG

El punto BamHI se subraya y los primeros codones de metionina y parada están en negrita.

60 Los cebos oligonucleótidos para amplificación L2 fueron:

5' - GCAGATCTATGAGTGCACGAAAAAGAGTAAACGTGCCAGTGC
5' - GCAGATCTTAGGCATGTTCCGTTTTCGTTCC.

Los puntos Bgl II están subrayados y los primeros codones de metionina y parada están en negrita. El fragmento amplificado 1478 bp L1 se clone) en el punto BamH1 en plásmido RK19 para producir RK19BPVL1. El gen L1 y el

ES 2 267 890 T3

promotor de vacuna 4b fueron aislados de este plásmido por digestión con *MluI* y *SmaI* y se transfirieron a plásmido pSX3 para producir PsxbpvII. El fragmento 1409 bp L2 fue digerido con *Bgl* II y se clonó a el punto BamH1 en plásmido p480 para producir p480BPVL2. El promotor tardío de vacuna sintético y el gen BPV L2 fueron clonados de este plásmido al punto *SmaI* para producir el plásmido doblemente recombinante PsxbpvI1I2. La transfección de 5 PsxbpvI1 y PsxbpvI2 ADN en monocapas de CV-1 infectadas con tipo salvaje (wt) VV WR RAZA resultado en el rVVs PsxbpvI1 VV (expresando L1) y PsxbpvI1L2VV (expresando L1 y L2). Los virus de vacuna recombinantes fueron purificados tres veces en presencia de ácido micofenólico. Después de la purificación, se realizaron preparaciones a gran escala y se usaron estos experimentos.

10 En la Figura 14 A se muestran análisis de inmunoprecipitación de BPV1 L1 recombinante en células infectadas de vacuna. Células CV-1 fueron infectadas a 10 pfu/célula con wt virus vacuna (Ruta 1); PsxbpvI1VV (Ruta 2); PsxbpvI1VV (Ruta 3) se cultivan 48 horas después de la infección. La proteína BPV1L1 fue detectada con antisero de conejo específico BPV1. La proteína 58 kDa L1 es indicada con una flecha.

15 En la Figura 14B se muestra el análisis de northern blot de la expresión BPV1 L2. ARN extraído de células CV-1 infectadas con wt VV (ruta 1); pSXBVL1 L2W (ruta 2) se probó con el gen BPV1 L2. La longitud variable de las transcripciones homólogas L2 es típica de las transcripciones expresadas de promotores Vv. Para inmunoprecipitación, 20 células infectadas con rVV fueron lisadas con búfer RIPA (0.1% SDS, Triton X-100, 1% dextrólato de sodio, 150 mM NaCl, 0.5 µg/ml aprotinina, 10 nM Tris, pH 7.4). Proteínas solubles fueron sometidas a inmunoprecipitación con anticuerpo anti BPV1 de conejo (DAKO, Glostrup) a dilución 1:1000. Se recogieron proteínas precipitadas con proteína-A sefarosa, se separaron en geles 10% SDA poliacrilamida y se secaron en filtros de nitrocelulosa. Después del bloqueo con leche desnudada, los filtros fueron expuestos al suero anti BPV1 (1:1000) seguido de ¹²⁵I- proteína A (0.1 µCi/ml) y se visualizó por auto radiografía. Se extrajo el total de ARN de las células y se purificó por centrifugación por medio de CsCl como se ha descrito previamente. El total de ARN, 30 µg por ruta, se introdujo en 1.2% de geles 25 formaldehído-agarosa, se transfirió a membranas de nylon y se probó con un gen BPV1 L1 etiquetado ³²P.

En la Figura 15A se hace referencia a pSXBVL1L2W. Algunas partículas de células CON/BPV infectadas con pSXBVL1L2VV tienen centros densos de electrones (Encarte).

30 En la Figura 15B se hace referencia a pSXBVL1VV. Un virus de vacuna contaminante en (A) se indica con una “V”. Las barras de escala representan 50 nm. Las células se cultivaron dos días después de la infección, se lavaron con PBS y fueron lisadas mediante procesos de congelación y descongelación tres veces y se sonificaron en PBS. Los restos de célula mediante centrifugación a baja temperatura, y los sobrenadantes se formaron en capas en un amortiguador de sacarosa a 20% (w/v) y centrifugó durante 2 horas a 100,000 x g. Las bolas fueron resuspendidas 35 en PBS y analizadas en un microscopio de electrón JEOL 1200EX después de tinción negativa con 1% (w/v) ácido fosfotungstico (pH. 7.0).

40 Debido a que el radio de proteínas L1 y L2 es aproximadamente 5:1 (Pfister, H. & Fuchs, E. in Papillomaviruses and Human Disease (eds. Syrjanen, K. Gissman, L & Koss, L. G) Vol. 1-18 (Springer-Verlag, Berlin, 1987), empleamos un promotor natural fuerte para el gen L1 y un promotor débil sintético para el gen L2 para nuestro VV doblemente recombinante (Fig. 13C), y el radio resultante de mARN L1 A mARN L2 sobre un northern blot de células CV-1 infectadas rVV fue aproximadamente 10:1. Las células CV-1 infectadas con esta proteína L1 BPV1 expresada rVV (Fig. 14A) y L2 mARN (Fig. 14B), y un gran número de partículas similares a virus icosaédricas de 50 nm de aparente auténtica morfología. Nuestro anterior trabajo con HPV16 había demostrado que ambas proteínas L1 y L2 eran necesarias para la formación de partículas similares a virus HPV16 como se ha descrito anteriormente, lo que contrasta con la observación de que para parvovirus (Kajigaya *et al.*, 1991 DNAS 4646-4650), virus de la lengua azul (Loudon *et al.*, 1991 Virology 182, 793-801), y virus del polioma (Salunke *et al.*, 1986, Cell 46, 895-904), partículas similares a virus se unen en células si la proteína cápsida mayor sola se expresa como una proteína recombinante. Por lo tanto, producimos un recombinante VV para BPV1 L1 (Fig 13C) y observamos que cuando células CV-1 45 estaban infectadas con este VV, las partículas similares a virus de morfología parecida a aquellas obtenidas con el VV doblemente recombinante de L1 y L2 podían purificarse (Fig. 15b). Viriones isocápicos similares se obtuvieron después de infectar células CV-1 con recombinante Vv para las proteínas L1 de HPV6 o HPAV11. La falta de viriones PV morfológicamente auténticos en células infectadas con el HPV16L1 o L2rVV, y la falta de viriones PV vistos en tejido infectado HPV16 por microscopía de electrón (Schneider (1987) Papillomaviruses and Human Disease Vol. 19-39 Springer Verlag Berlin), sugiere que HPV16 a diferencia de otros PVs puede ser defectuoso con respecto a la 50 formación cápsida viral.

Una minoría de partículas similares a virus de células infectadas con el VPV1 L1/L2 rVV se muestra en el encarte de la Figura 15a.

60 La estrategia de clonación para HPV11 L1/L2 y HPV6bL1/L2 dobles que expresan virus de vacuna recombinante se describe del siguiente modo:

Para HPV11L1:

65 5' CAGATCTCAGATGTGGCGGCCTAGCGACAGCACAGTATATGTGCC

5' CGGGAATTCTGTAAACAGGACACACATAATAATTGTTATTGCACAAAAA

ES 2 267 890 T3

El producto PCR fue digerido por BgIII/EcoRI y se clonó a RK19 bajo el control del impulsor 4b. La secuencia promotor/11L1 fue posteriormente clonada al punto pSX3 BamH1 despuntada por Klenow. El plásmido resultante fue pSX11L1.

5 Para 11L2:

5' GCGGATCCCATGAAACCTAGGGCACGCAGACGTAAACGTGCG

5' CGCCC~~GGG~~CTAGGCCACATCTGTAAAAAATAAGGG

10 El Bam/H1/SmaI digerido por el fragmento PCR fue clonado a p480 bajo promotor tardío sintético 28k. Después, el fragmento promotor/11L2 fue transferido a pSX11L1. El doble recombinante 11L1/L2 que expresa plásmido fue llamado p SX11 L1/L2.

15 Para HPV6bL1:

5' CGCCC~~GGG~~TACCTTTAGTTTGGCGCGCTTACGTTAGG

5' GCGGATCCAGATGTGGCGGCCTAGFCGACAGCACAGTATATG

20 El producto PCR se cortó con BamH1/SmaI y se clonó a RK19 bajo control del promotor 4b. El promotor/6L1 fue después clonado a pSX3 para producir pSX6L1.

25 Para HPV8L2:

El HPV6L2 fue aislado del genoma 6b por AccI/XbaI (4422-5903). El fragmento se secó por Klenow y se introdujo en p480. El promotor sintético 28K más 6bL2 fue clonado a pSX6L1 para formar el plásmido doble recombinante pSX6L1/L2.

30 Posteriormente, plásmidos pSX11L1 y pSX11L1/L2 infectaron una célula huésped (por ejemplo células CV-1 o células C127) para producir VV pSX11L1 y VV pSX11 L1/L2 que después de la trasfección de una célula huésped infectada con virus de vacuna de tipo salvaje formó VLPs que contenían proteína L1 (derivada de VV pSX11 L1) y proteína L1 y L2 (derivada de pSX11 L1/L2). De modo similar, VV pSX6L1 y VV pSX6L1/L2 después de la trasfección de una célula huésped produjeron VLPs que contenían HPV6b L1 y VLPs que contenían HPV6b L1 y HPV6b L2.

35 También se apreciará que la invención incluye dentro de su campo virus doblemente recombinantes para proteínas L1 y L2 cápsidas de virus de papiloma así como virus recombinante que contiene proteína L1 cápsida de virus de papiloma.

40 Además, también se observará que la invención incluye dentro de su campo un método de diagnóstico de infección de virus de papiloma por ELISA que incluye el paso de detección de partículas VLP que contienen proteínas L1 y L2.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 267 890 T3

TABLA 1

Péptidos superpuestas 15AA de la secuencia pronosticada de la proteína HPV16 L1					
Nº	Secuencia	Rango	Nº	Secuencia	Rango
1	MQVTFIYILVITCYE	(1-15)	28	SLFFYLREQMFVRH	(271-285)
2	ITCYENDVNVYHIFF	(11-25)	29	MFVRHLFNRAGTVGE	(281-295)
3	YHIFFQMSLWLPSEA	(21-35)	30	GTVGENVPDDLYIKG	(291-305)
4	LPSEATVYLPVPVPS	(31-45)	31	LYIKGSGSTANLASS	(301-315)
5	PVPVSKV/VSTDEYVA	(41-55)	32	NLASSNYFPTPSGSM	(311-325)
6	DEYVARTNIYYHAGT	(51-65)	33	PSGSMVTSDAQIFNK	(321-335)
7	YHAGTSRLLAVGHPY	(61-75)	34	QIFNKPYWLQRAQGH	(331-345)
8	VGHPYFPPIKKPNNNK	(71-85)	35	RAQGHNNNGICWGNQL	(341-355)
9	PNNNKILVPKVSGLQ	(81-95)	36	WGNQLFVTVDTRRS	(351-365)
10	VSGLCQYRVFRHLPD	(91-105)	37	DITRSTNMSLCAIS	(361-375)
11	IHLDPDNKFGFPDTS	(101-115)	38	CAAISTSETTYKNTN	(371-385)
12	FPDTSFYNPDTQRLV	(111-125)	39	YKNTNFKEYLRHGE	(381-395)
13	TQRLVWACVGVEVGR	(121-135)	40	RHGEELYDLQFIFQLC	(391-405)
14	VEVGRGQPLGVGISG	(131-145)	41	IFQLCKITLTADVMT	(401-415)
15	VGISGHPLLNKLDdT	(141-155)	42	ADVMTYIHSMNSTIL	(411-425)
16	KLDDTENASAYAANA	(151-165)	43	NSTILEDWNFGLQPP	(421-435)
17	YAANAGVDNRECISM	(161-175)	44	GLQPPPGGTLEDTYR	(431-445)
18	ECISMDYKQTQLCLI	(171-185)	45	EDTYRFVTQAIACQK	(441-455)
19	QLCLIGCKPPIGEHW	(181-195)	46	IAcqKHTPPAKEDD	(451-465)
20	IGEHWGKGSPCTNVA	(191-205)	47	PKEDDPLKKYTFWEV	(461-475)
21	CTNVAVNPDCPPL	(101-215)	48	TFWEVNLKEKFSADL	(471-485)
22	CPPLEINTVIQDGD	(211-225)	49	FSADLDQFPLGRKFL	(481-495)
23	IQDGDMVHTGFGAMD	(221-235)	50	GRKFLLQAGLKAKPK	(491-505)
24	FGAMDFTTLQANKSE	(231-245)	51	KAKPKFTLGKRKATP	(501-515)
25	ANKSEVPLDICTSIC	(241-255)	52	RKATPTTSSTTAK	(511-525)
26	CTSICKYPDYIKMVS	(251-265)	53	STTAKRKKRKL	(521-531)
27	IKMVSEPYGDSLPFY	(261-275)			

La secuencia de cada péptido L1 se da usando el sencillo código con letras. La posición de cada péptido dentro de la proteína HPV16 L1 se da asignando la posición 1 al terminal T de metionina. El péptido corto de terminal C (nº 53) no se utilizó para estos experimentos

TABLA 2

Inmunoreactividad para partículas similares a virus de suero de ratones inmunizados con cápsidos sintéticos HPV16			
Reactividad con partículas similares a virus			
Raza de ratón	Ratones inmunizados con VLPs		Inmunizados con CFA
	Expt 1 (n=5)	Expt 2(n=5)	n=2
BALB/C	1.06 ± 0.29*	1.71 ± 0.06	0.36 ± 0.04
B10A	1.08 ± 0.06	1.75 ± 0.04	0.24 ± 0.02
C57Bl/6	0.86 ± 0.20	1.70 ± 0.12	0.25 ± 0.03

* Los valores son unidades OD415 y se dan como el promedio ± 1 de desviación estándar.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido que consiste básicamente en el segmento polinucleótido del genoma HPV16 que comienza en nt5637 y que también codifica HPV16L1 que tiene un peso molecular de aproximadamente 57 kDa.
- 10 2. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polinucleótido es ADN.
- 15 3. Una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína HPV 16 L1 que tiene un peso molecular de aproximadamente 57 kDa que forma partículas similares a virus con proteína HPV16 L2, que consta del segmento polinucleótido del genoma HPV16 que comienza en nt 5637.
- 20 4. Una molécula de ADN combinante de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha molécula es seleccionada de un plásmido, cósmico, PTO un vector, un baculovirus, un virus de vacuna, un adenovirus, y un retrovirus.
- 25 5. Una molécula recombinante de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde dicho polinucleótido está funcionalmente unido a un promotor.
- 30 6. Una molécula recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho promotor es un promotor viral.
- 35 7. Una molécula recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho promotor viral es un promotor de virus de vacuna.
- 40 8. Una molécula recombinante de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho promotor es el promotor 4b de virus de vacuna.
- 45 9. Una molécula recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho promotor es un promotor de mamíferos.
- 50 10. Una molécula recombinante de acuerdo con las reivindicaciones de 3 a 9, donde dicho polinucleótido está funcionalmente unido a una señal de poliadenilación.
- 55 11. Una molécula recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha señal de poliadenilación es viral.
- 60 12. Una molécula recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha señal de poliadenilación es de mamíferos.
- 65 13. Una célula huésped que consta de un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2.
- 70 14. Una célula huésped que consta de una molécula recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 12.
- 75 15. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, donde dicha célula es seleccionada de una célula procariótica y una célula eucariótica.
- 80 16. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha célula procariótica es *E. coli*.
- 85 17. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha célula eucariótica es seleccionada de una célula de levadura, una célula de insecto, y una célula de mamífero.
- 90 18. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicha célula es una célula CV1.
- 95 19. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicha célula es una célula *S. frugiperda*.
- 100 20. Un polipéptido codificado por i) el polinucleótido de cualquiera de las reivindicación s 1 a 2 o ii) la molécula recombinante ADN de acuerdo las reivindicaciones de 3 a 12.

ES 2 267 890 T3

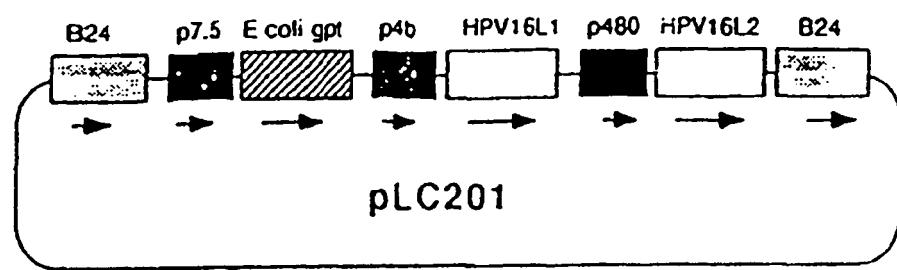


FIG 1

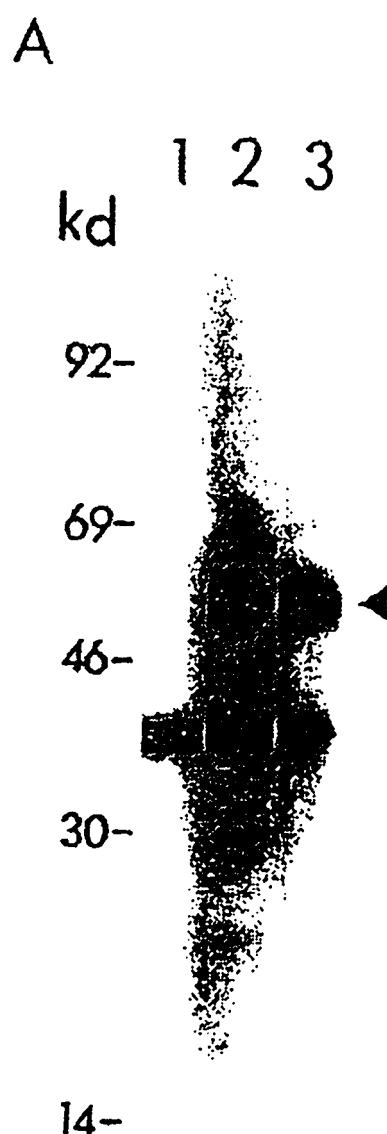


FIG 2A

B

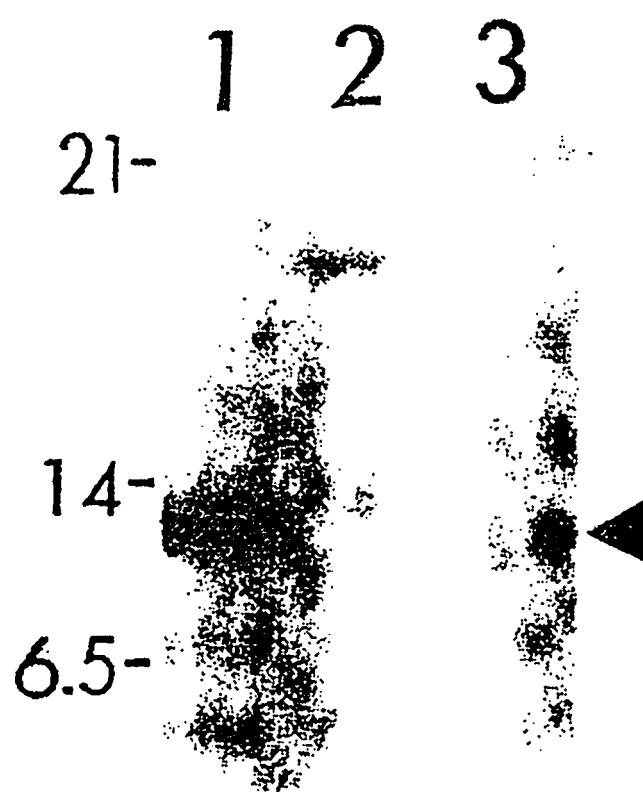


FIG 2B



FIG 3

ES 2 267 890 T3

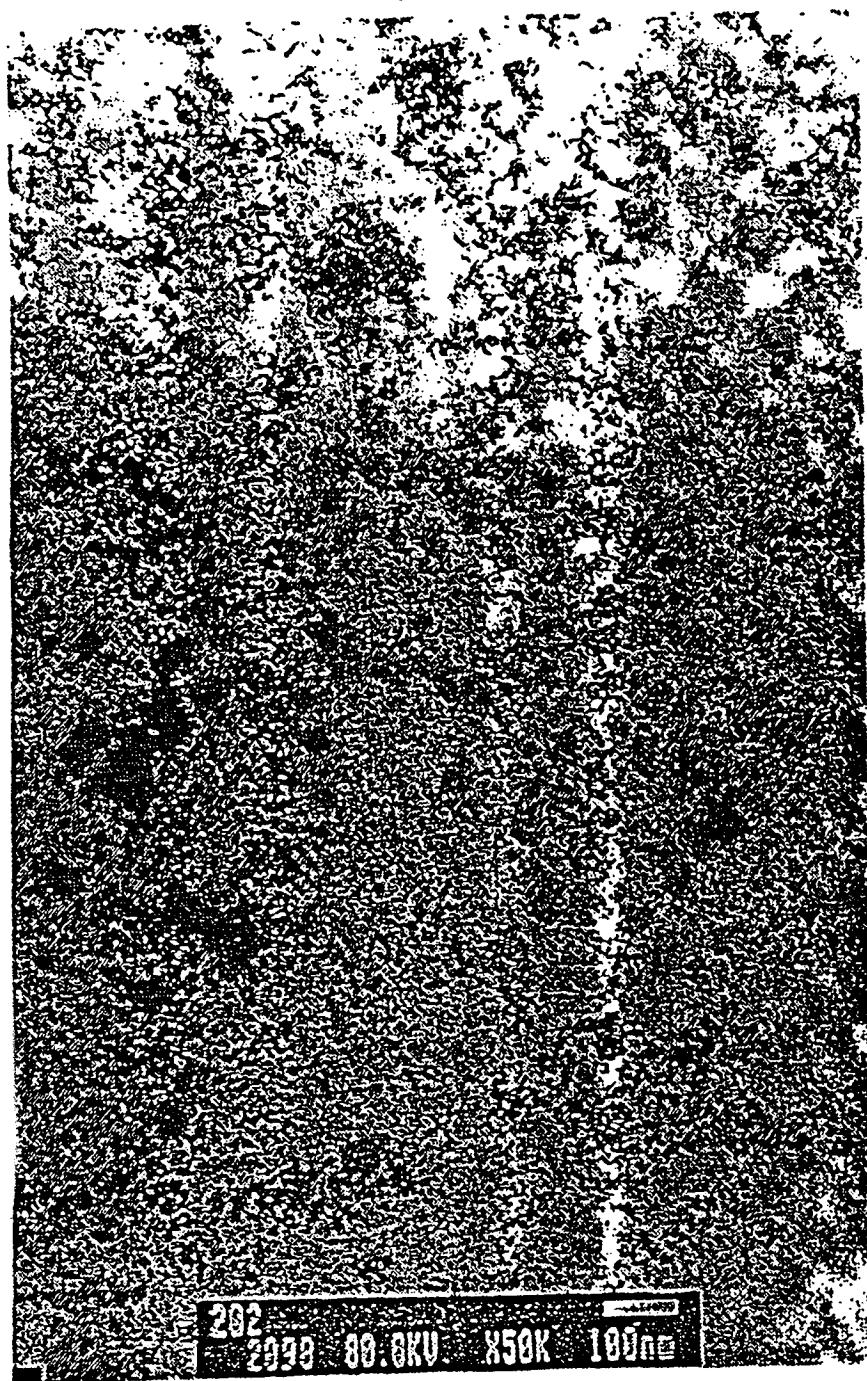


FIG 4A

ES 2 267 890 T3

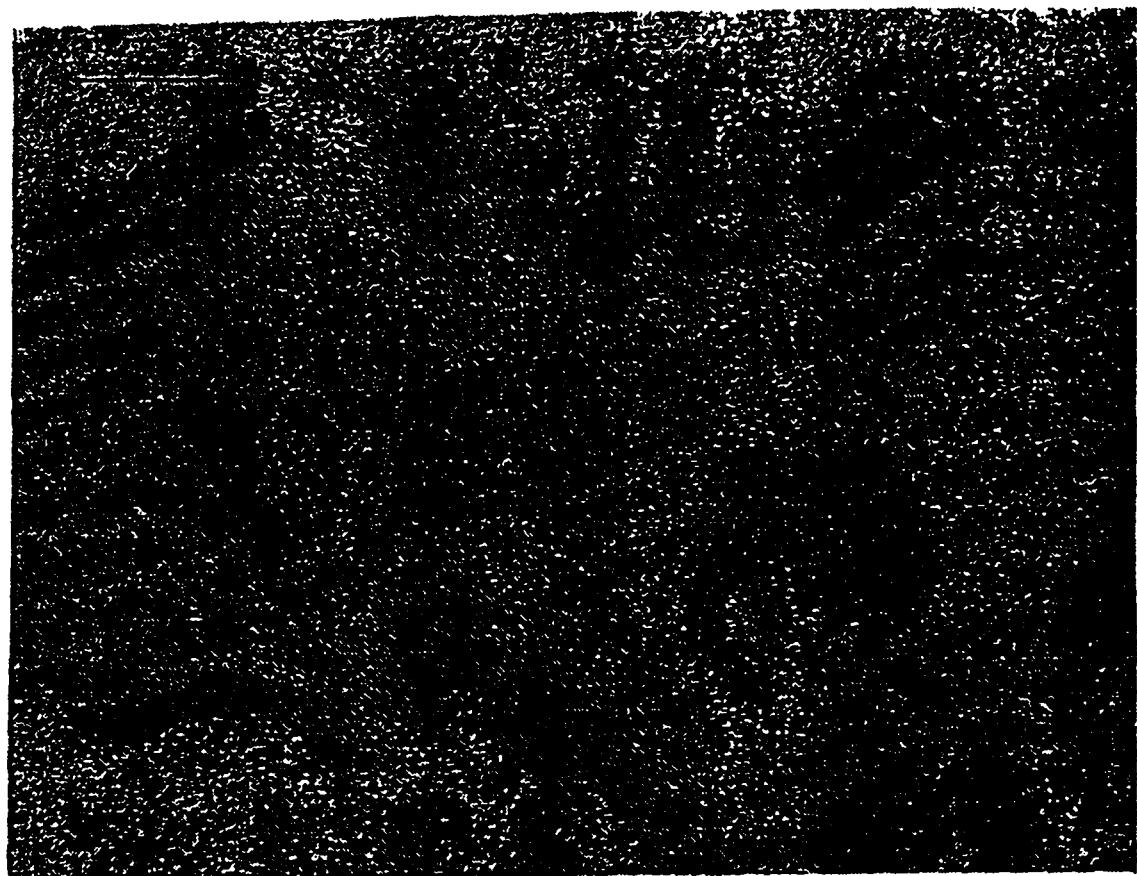


FIG 4B

ES 2 267 890 T3

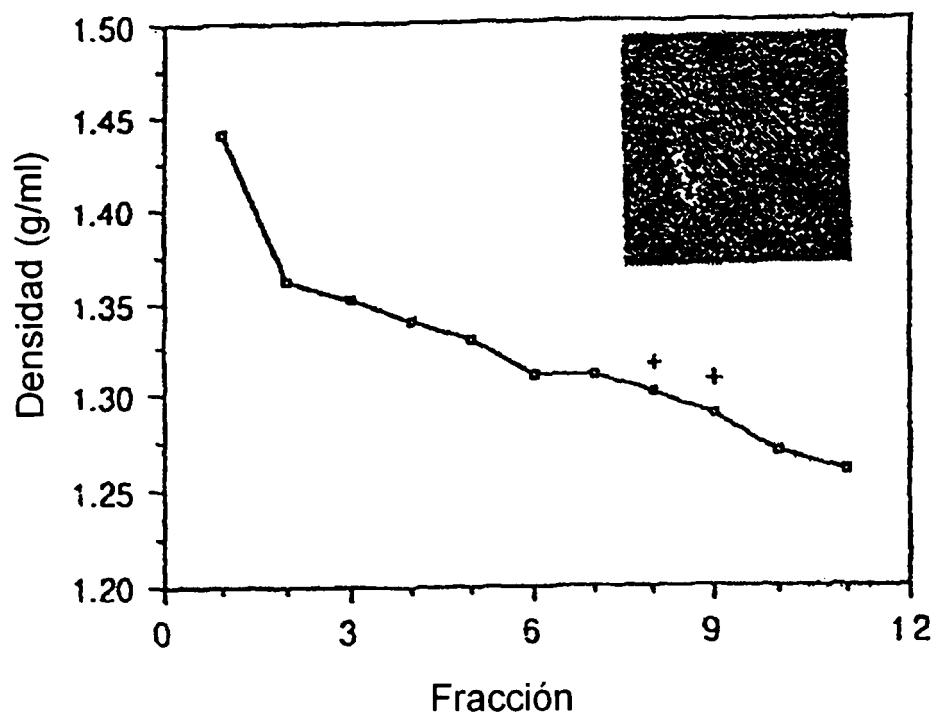


FIG 5

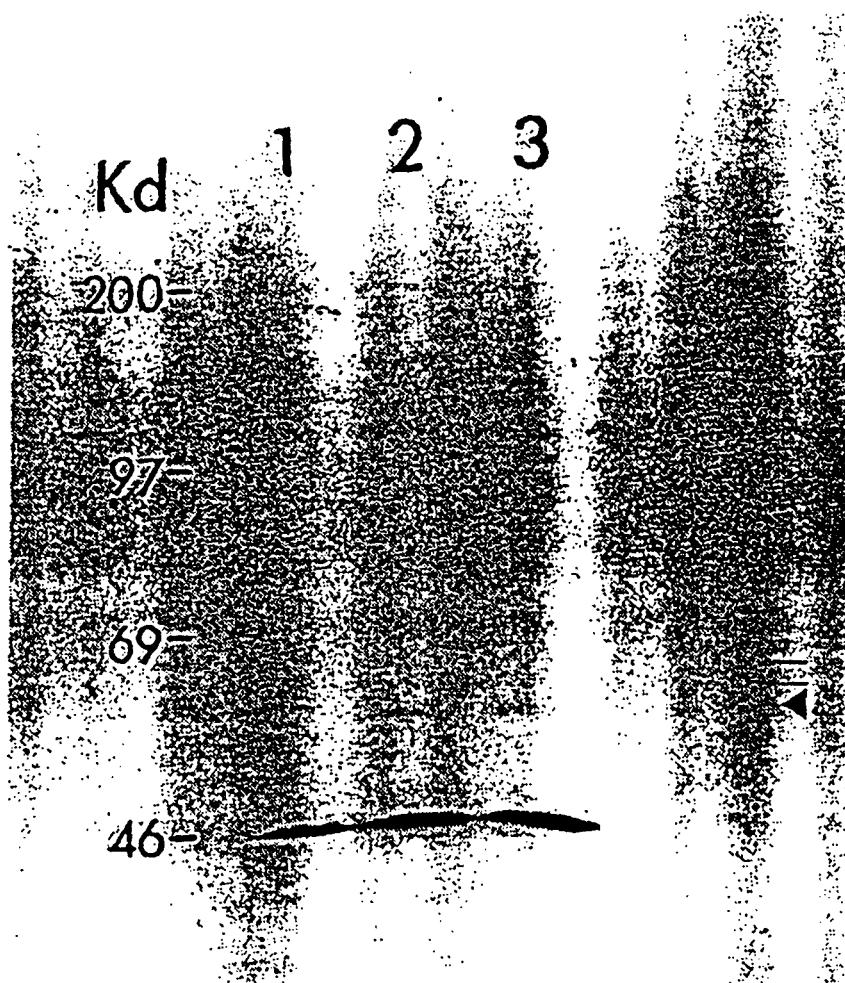
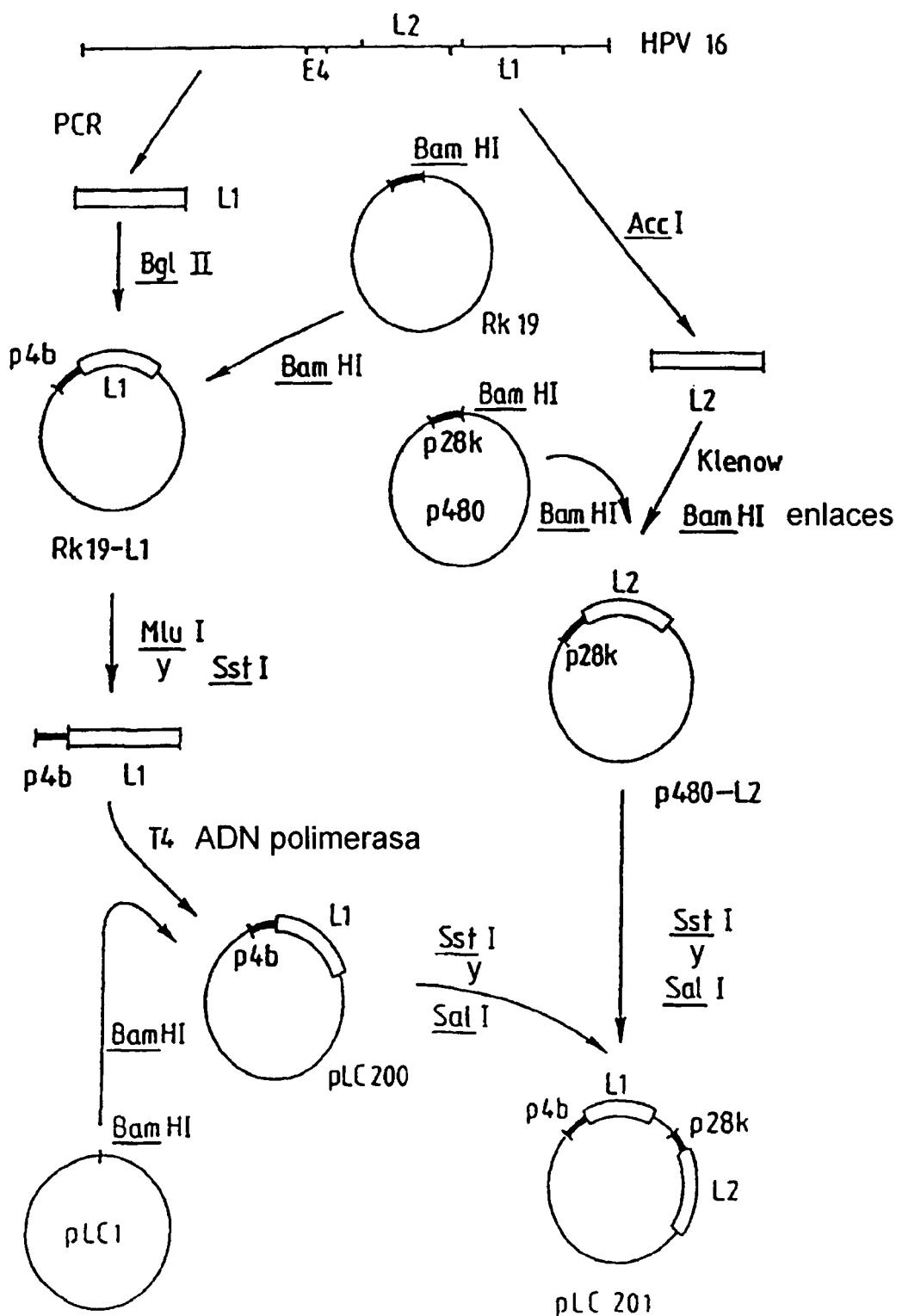


FIG 6

FIG 7



ES 2 267 890 T3

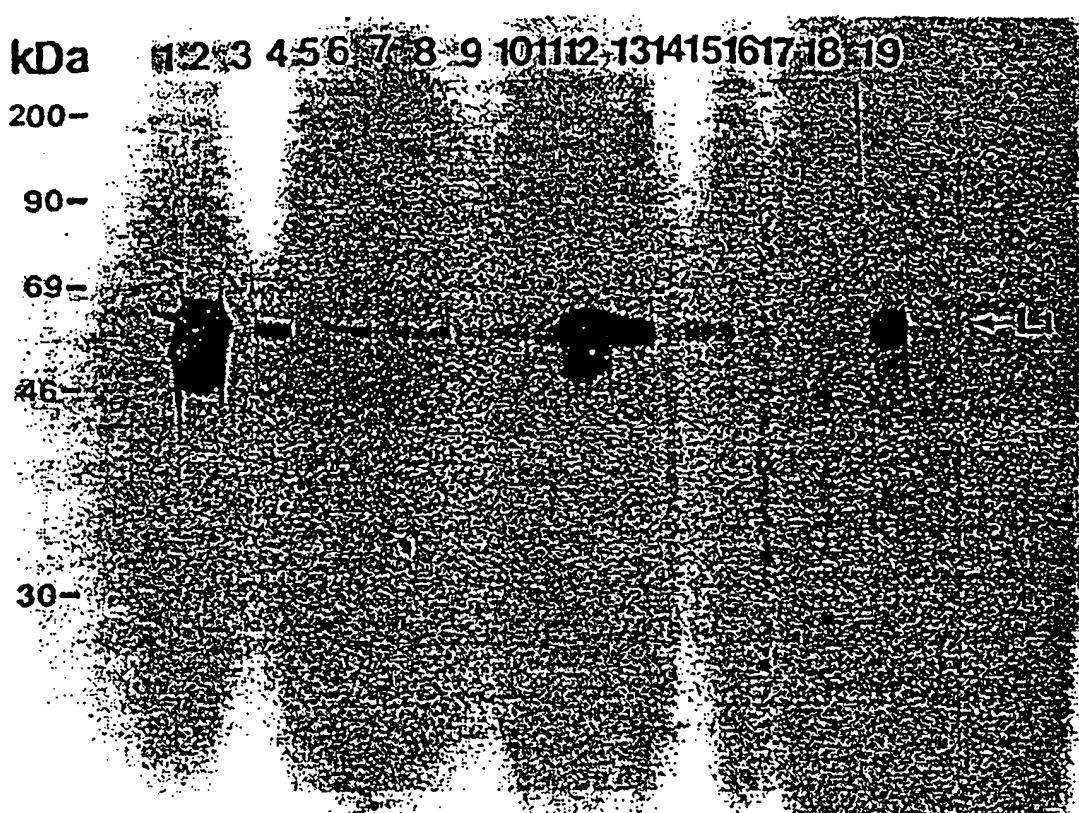


FIG 8

ES 2 267 890 T3

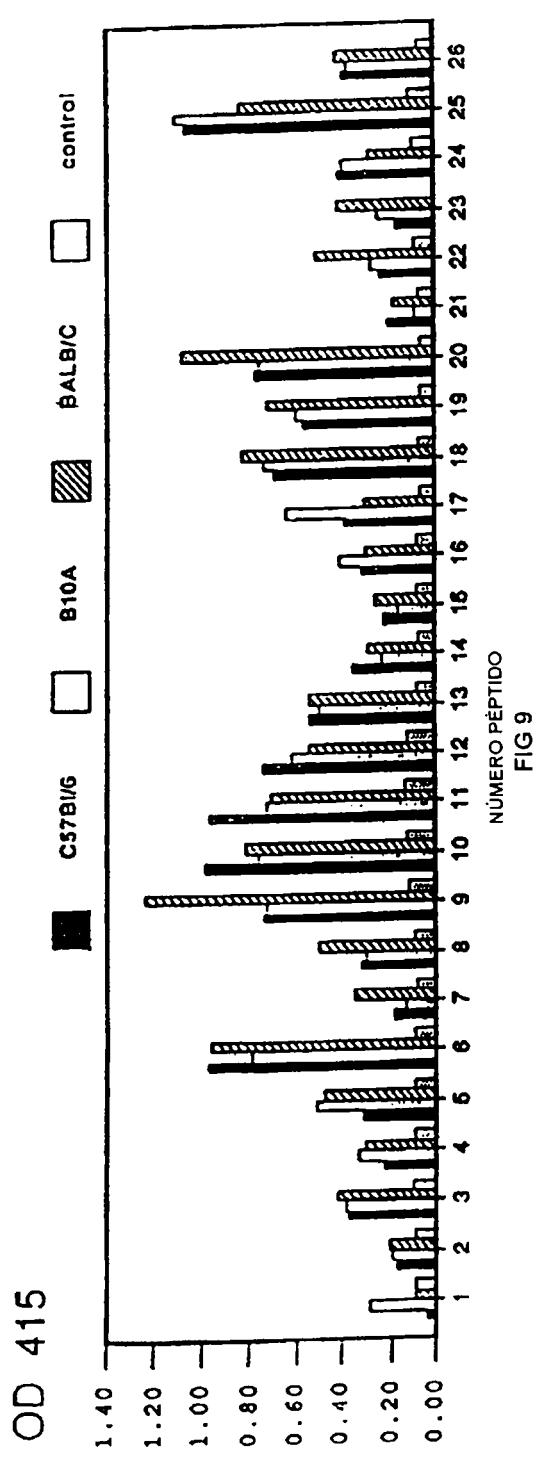


FIG 9

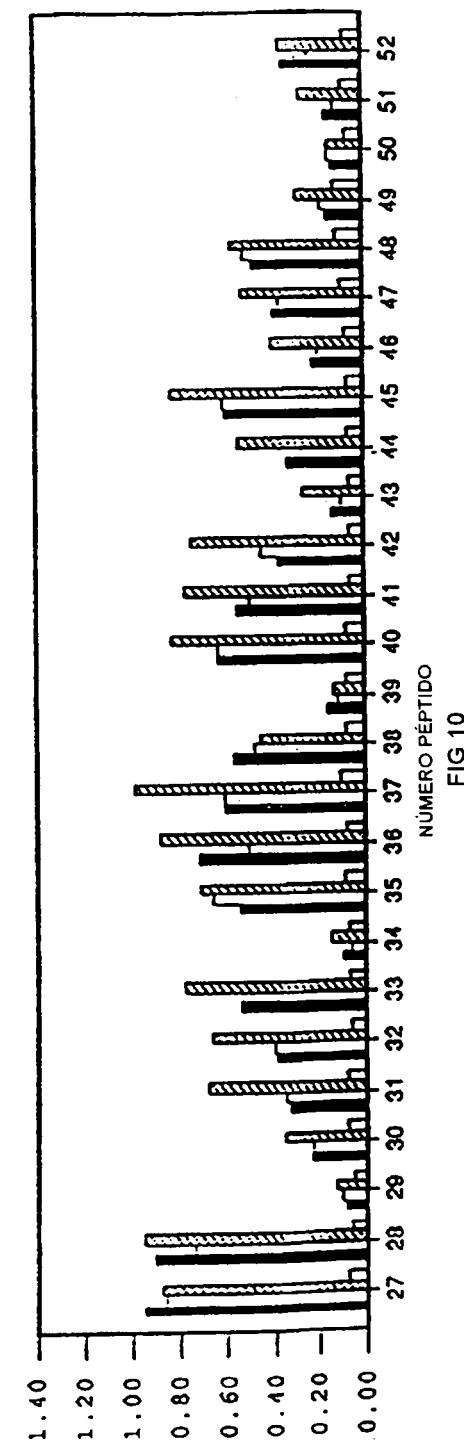


FIG 10

FIG 11

OD 415

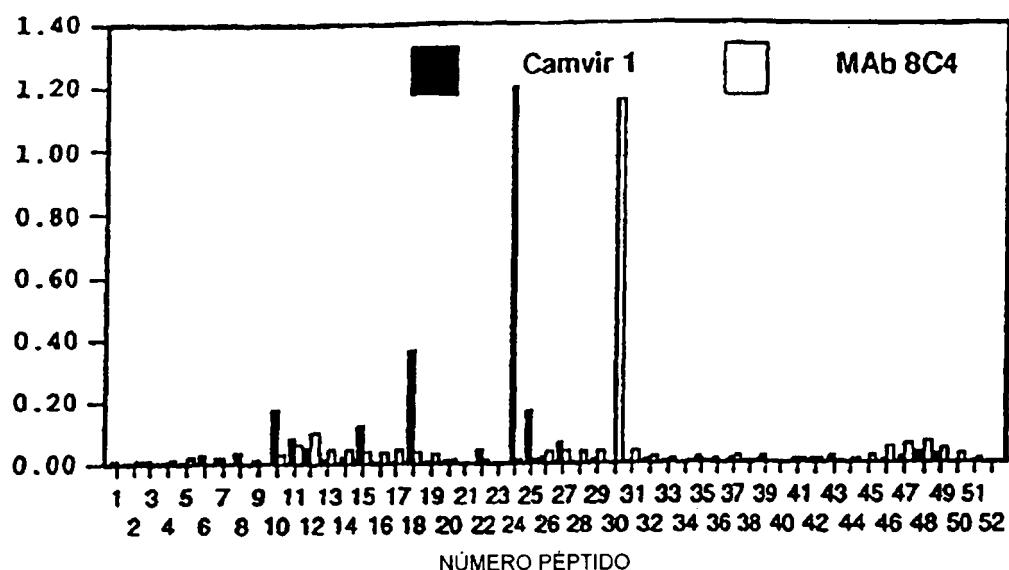
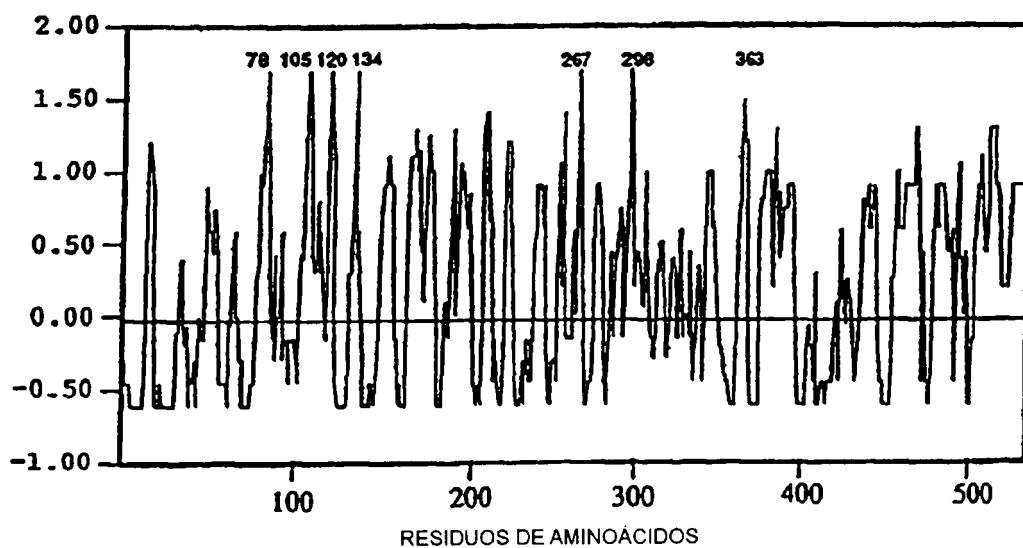


FIG 11A

Índice Antigénico



ES 2 267 890 T3

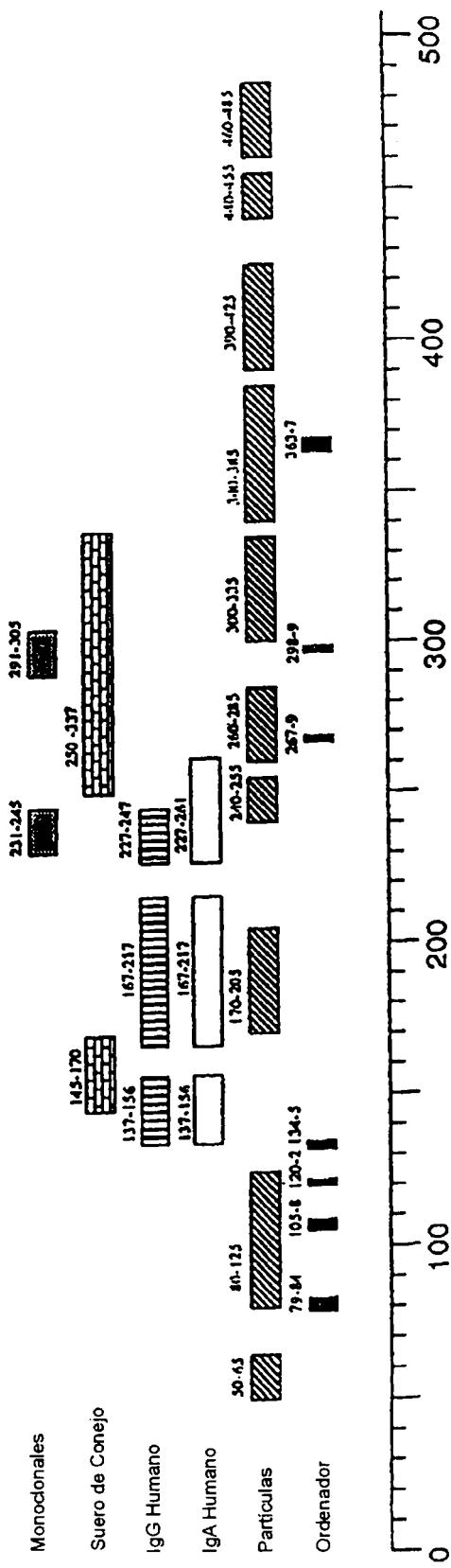


FIG 12

ES 2 267 890 T3

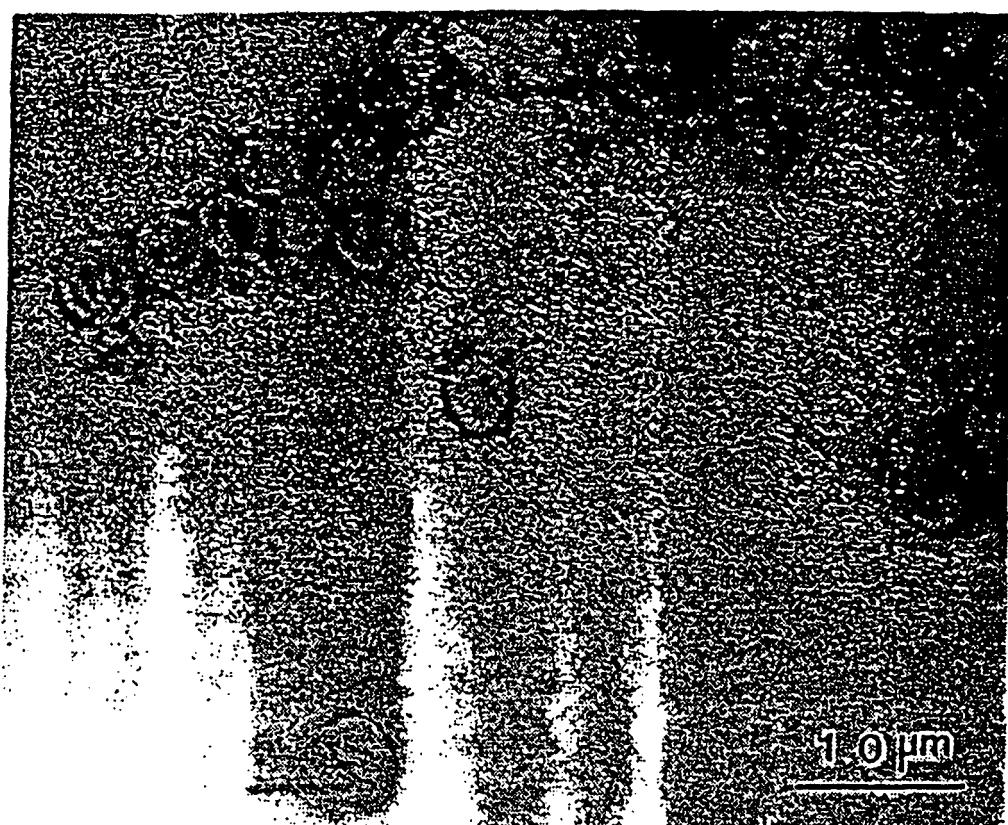


FIG 13A

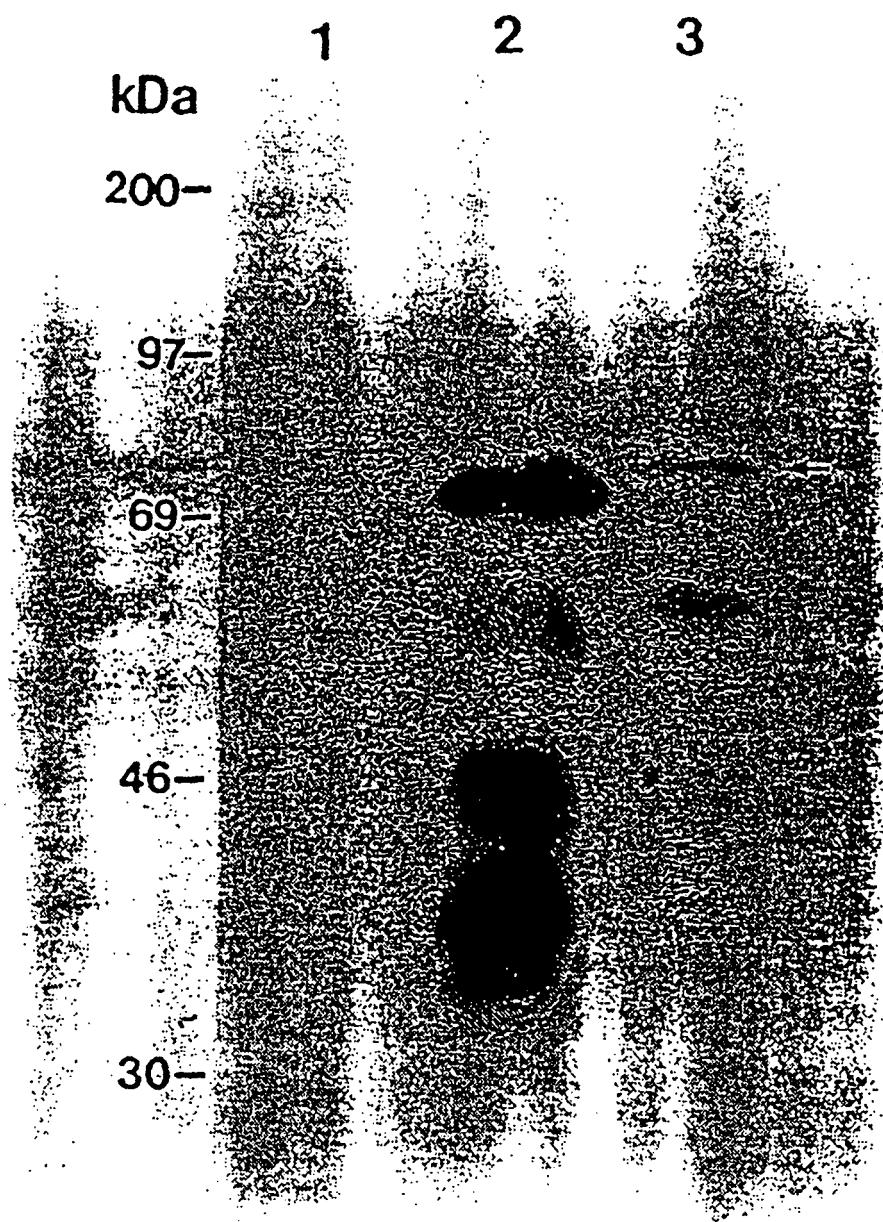


FIG 13B

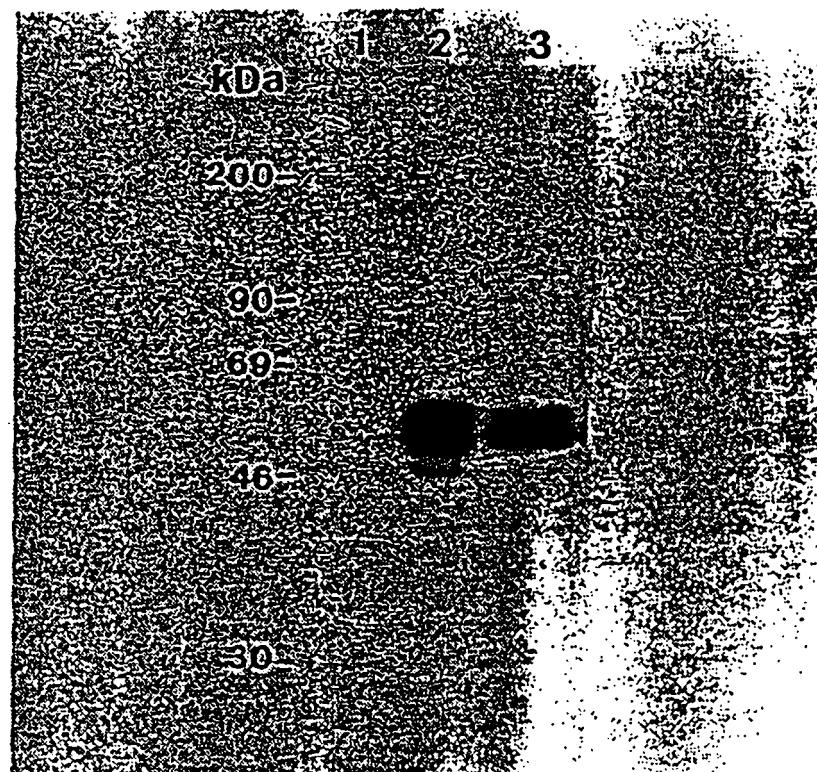


FIG 14A

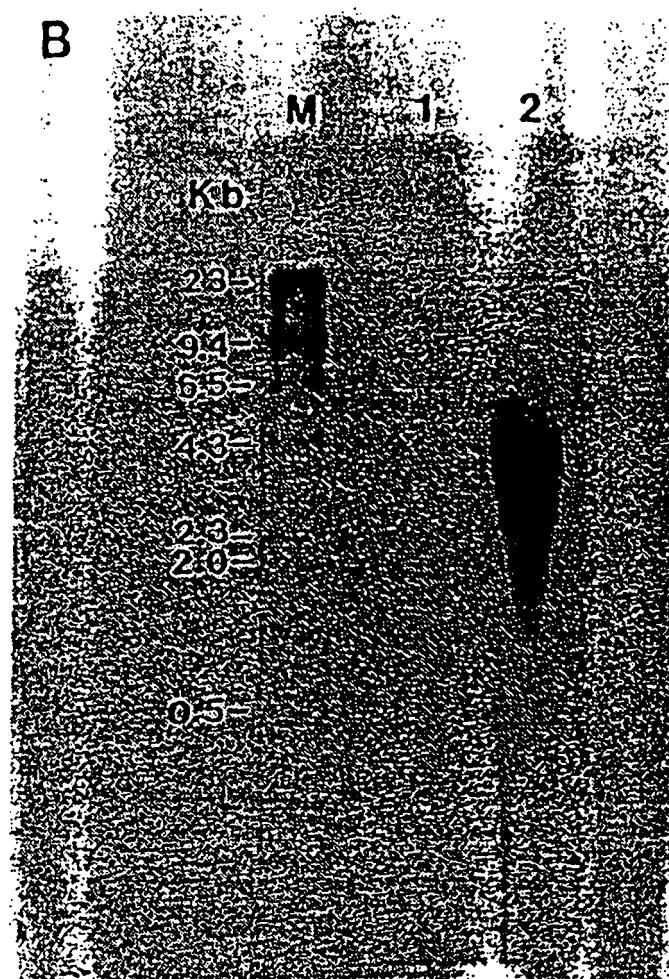


FIG 14B

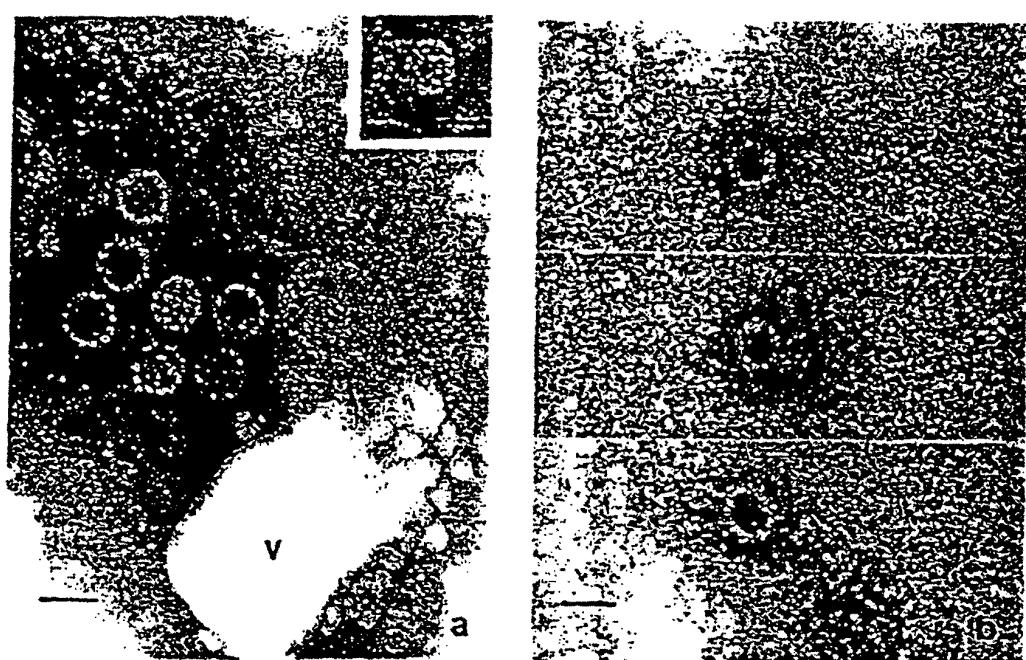


FIG 15