

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 628**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/04** (2006.01)

**C12N 15/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.1998 E 06075489 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 1700911**

54 Título: **Método in vitro para desmontaje/remontaje de partículas análogas al virus del papiloma humano (VLP)**

30 Prioridad:

**05.09.1997 US 923997**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**01.06.2016**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, INC. (100.0%)  
35 WEST WATKINS MILL ROAD  
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**MCCARTHY, MICHAEL P. y  
SUZICH, JOANN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 572 628 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 para desmontaje/remontaje de partículas análogas al virus del papiloma humano (VLP)

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona un medio muy eficaz para desmontar partículas análogas al virus del papiloma (VLPs) en capsómeros y/o subunidades inferiores, y volver a montarles en VLP. Estas composiciones que contienen VLP nuevamente montadas producidas por la invención expresan epítomos conformacionales neutralizantes y tienen elevada homogeneidad y comprenden por tanto agentes eficaces profilácticos y diagnósticos para el diagnóstico o la prevención de la infección por el virus del papiloma. También, la presente invención se refiere a uso de dichas VLP para la encapsulación de restos deseados, por ejemplo, agentes terapéuticos o diagnósticos, y el uso de los mismos como pseudoviriones para evaluar la eficacia de posibles vacunas o compuestos terapéuticos.

15 **Antecedentes de la invención**

El virus del papiloma infecta una amplia variedad de diferentes especies de animales, entre las que se incluyen los seres humanos. La infección se suele caracterizar por la inducción de tumores benignos epiteliales y fibroepiteliales, o verrugas, en el sitio de la infección. Cada especie de vertebrado se infecta por un conjunto de virus del papiloma específico de la especie, que comprende diferentes tipos del virus del papiloma. Por ejemplo, se han aislado más de sesenta tipos diferentes de genotipos del virus del papiloma humano (VPH). Los virus del papiloma son agentes infecciosos fuertemente dependientes de la especie. Por ejemplo, los virus del papiloma de cánidos y conejos no pueden inducir papilomas en especies heterólogas como seres humanos. La inmunidad neutralizante de la infección contra un tipo del virus del papiloma no confiere inmunidad contra otro tipo, incluso aunque ambos tipos infecten una especie homóloga.

En los seres humanos, los virus del papiloma ocasionan verrugas genitales, una enfermedad de transmisión sexual frecuente. Los tipos 6 y 11 del VPH se asocian con mucha frecuencia condilomas acuminados benignos del tipo condilomata acuminata. Las verrugas genitales son muy comunes, y las formas subclínicas o no evidentes de la infección por VPH son incluso más habituales que la infección clínica. Aunque la mayoría de las lesiones inducidas por el VPH son benignas, las lesiones que ocasionan algunos tipos de virus del papiloma, por ejemplo, VPH-16 y VPH-18, pueden experimentar una evolución maligna. Además, la infección por uno de los tipos de virus del papiloma asociados a malignidad se considera un factor de riesgo significativo para el desarrollo de cáncer de cuello de útero, el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres de todo el planeta. Entre los tipos del VPH implicados en el cáncer de cuello de útero, el VPH-16 es el más habitual, y se encuentra en aproximadamente el 50 % de los cánceres de cuello de útero.

A la vista de los riesgos para la salud significativos que plantea la infección por el virus del papiloma de una forma general, y de la infección por el virus del papiloma humano en particular, varios grupos han notificado el desarrollo de antígenos recombinantes del virus del papiloma y su uso como agentes diagnósticos y como vacunas profilácticas. En general, dichas investigaciones se han centrado en la producción de vacunas profilácticas que contienen la proteína principal de la cápsida (L1) en solitario o combinada con la proteína secundaria de la cápsida (L2). Por ejemplo, Ghim et al, *Virology*, 190:548-552 (1992), notificaron la expresión de la proteína L1 del VPH-1 usando una expresión de vaccinia en células Cos, que muestra epítomos conformacionales y el uso de la misma como vacuna o para la tipificación o detección serológica. Este trabajo es también la base de una solicitud de patente, la que tiene como número de serie 07/903.109, presentada el 25 de junio de 1992 (abandonada en favor del documento con número de serie 08/216.506, presentada el 22 de marzo de 1994), de la que se ha otorgado una licencia al cesionario de la presente solicitud. También, Suzich et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 92:11553-11557 (1995), notificaron que la inmunización de cánidos con un virus del papiloma canino oral (VPCO) recombinante expresado en un sistema de baculovirus/célula de insecto previno en su totalidad el desarrollo de papilomas víricos mucosales. Estos resultados son importantes dadas las similitudes significativas entre muchos VPH y VPCO. Por ejemplo, muchos VPCO están asociados al cáncer anogenital y genital, infecta e induce lesiones en un sitio de mucosa, análogamente al VPH. También las secuencias L1 del VPCO comparten similitudes estructurales con las secuencias de L1 del VPH. Dadas estas similitudes, el modelo del VPCO/beagle es útil para la investigación de vacunas que contienen la proteína L1, por ejemplo, en la investigación de la respuesta inmunitaria protectora, la protección frente a la infección natural y la optimización de los protocolos de vacunación. (*Id.*)

También, un grupo de investigación de la Universidad de Rochester notificó la producción de la proteína principal de la cápsida (L1) del virus del papiloma humano y de partículas análogas a virus usando un sistema de expresión en baculovirus/célula de insecto (Rose et al, Universidad de Rochester, documento WO 94/20137, publicado el 15 de septiembre de 1994). En particular, notificaron la expresión de la proteína principal de la cápsida L1 de VPH-6 y VPH-11 y la producción de partículas análogas a VPH-6, VPH-11, VPH-16 y VPH-18.

Además, un grupo de investigación de la Universidad de Queensland también divulgó intencionadamente la fabricación recombinante de las proteínas L1 y/o L2 del virus del papiloma, así como su uso potencial como vacunas (Frazer et al, documento WO 93/02189, publicado el 4 de febrero de 1993).

Aún más, un grupo de investigación del gobierno de los Estados Unidos notificó proteínas de la cápsida del virus del papiloma supuestamente capaces de autoensamblarse en estructuras de capsómeros y cápsidas víricas que comprenden epítomos antigénicos conformacionales (patente de Estados Unidos n. ° 5.437.951, Lowy et al, concedida el 1 de agosto de 1995). Las reivindicaciones de dicha patente se dirigen a una secuencia específica de ADN del VPH-16 que codifica una proteína L1 capaz de autoensamblarse, y al uso de la misma para expresar cápsidas recombinantes del VPH-16 que contienen dicha proteína L1 del VPH-16.

Con respecto de las vacunas que contienen la proteína de la cápsida del VPH, los expertos en la materia aceptan ampliamente que un prerrequisito fundamental de una vacuna basada en la proteína principal de la cápsida L1 del VPH es que estén presentes los epítomos conformacionales presentes en la proteína L1 expresados por las proteínas principales de la cápsida del virus del papiloma humano (véase, Hines et al, *Gynecologic Oncology*, 53:13-20 (1994); Suzich et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 92:11553-11557 (1995)).

Se han notificado en la bibliografía las proteínas L1 del VPH tanto no particuladas como particuladas recombinantes que presentan los epítomos conformacionales de L1 de VPH. Se sabe que L1 es estable en varias configuraciones oligoméricas, por ejemplo (i) capsómeros que comprenden pentámeros de la proteína L1 y (ii) cápsidas que están compuestas por setenta y dos capsómeros en una estructura icosaédrica T=7. También, se sabe que la proteína L1, cuando se expresa en células eucariotas por sí misma, o junto con L2, es capaz de un autoensamblaje eficaz en estructuras de tipo cápsida que se denominan de manera general partículas análogas a virus (VLP).

Se ha demostrado que las VLP son morfológica y antigénicamente similares a los viriones auténticos. Además, se ha notificado que la inmunización con VLP desencadena la producción de anticuerpos neutralizantes del virus. Más específicamente, los resultados con una variedad del virus del papiloma de animales (virus del papiloma oral de cánidos y virus del papiloma bovino 4) han sugerido que la inmunización con VLP da como resultado protección contra posteriores infecciones por el virus del papiloma. En consecuencia, las VLP compuestas por proteínas L1 del HPH se han propuesto como vacunas para prevenir enfermedades asociadas con las infecciones por el virus del papiloma humano.

Por ejemplo, se ha notado que la proteína L1 se puede ensamblar en VLP cuando se expresa usando vectores víricos recombinantes de baculovirus y vaccinia y 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)).

La mayoría de las preparaciones de L1 recombinante anteriores aisladas de células eucariotas han dado como resultado una población variable de VLP con un diámetro aproximado de 55 nm, que tienen un aspecto similar a los viriones intactos. Sin embargo, el montaje de VLP es ligeramente sensible para el tipo de célula. Por ejemplo, la L1 expresada en *Escherichia coli* se expresa en gran medida en forma de capsómeros o más pequeñas, con pocas o ninguna cápsida eficiente ni en la célula ni después de la purificación (Rose et al, *J. Virol.*, 67:1936-1944 (1993); Li et al, *J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)). Se observaron resultados similares con la proteína VP1 del virus del poliovirus expresado en *E. coli* (Salunke et al, *Biophys. J.*, 56:887-900 (1989)).

Hasta la fecha, no se ha informado de un método eficaz *in vitro* para el desmontaje y posterior montaje cuantitativo de las VLP del virus del papiloma. Dicho método sería muy ventajoso si permitiera ventajosamente la preparación de VLP más estables y/u homogéneas del virus del papiloma. Esto sería beneficioso, ya que tanto la homogeneidad como la estabilidad son preocupaciones significativas en la preparación de las vacunas, y en su caracterización durante la fabricación. Además, la capacidad de desmontar y volver a montar las VLP tiene aplicaciones importantes en la purificación de VLP. Las proteínas L1 del VPH expresadas en células eucariotas se ensamblan espontáneamente para formar VLP, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la mayoría de procedimientos para purificar las proteínas se han diseñado para purificar proteínas más pequeñas que las VLP de 55 nm y 20 millones de dalton. El potencial para desmontar las VLP extraídas de células eucariotas hasta el nivel de capsómeros L1 o inferior, purificar los componentes más pequeños usando técnicas convencionales y, a continuación, volver a montarlas para formar los VLP en el estado del proceso de purificación deseado es algo muy potente, y en la actualidad se utiliza para la purificación de las VLP del VPH-16<sub>Tr</sub>, como se describe a continuación (compuestas de una forma mutada de la proteína VPH-16 L1 de la que se han borrado 34 aminoácidos del extremo C). Finalmente, la capacidad para desmontar y volver a montar las VLP *in vitro* permite empaquetar los compuestos exógenos deseados dentro de la VLP montada de nuevo.

Los intentos anteriores para desmontar las VLP del papiloma incluyeron experimentos basados en un trabajo anterior realizado sobre el virus del papiloma, un papovirus relacionado, donde se mostró que tanto la reducción de disulfuros como la quelación de cationes eran esenciales para el desmontaje del virion (Brady et al, *J. Virol.*, 23:717-724 (1977)). Sin embargo, en el caso de las VLP del VPH, se demostró que niveles bajos de agente reductor (DTT 1-10 mM) que proporciona el desmontaje óptimo del virus del poliovirus en presencia de bajos niveles de agentes quelantes (por ejemplo, EGTA 0,5-10 mM) solo fueron ligeramente eficaces para el desmontaje de la VLP del virus del papiloma (véase la Tabla 1, Li et al, *J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)). Por el contrario, se ha demostrado que VLP

de L1 del HPH-11 parcialmente tripsinizadas se desmontan de una forma eficaz en dichas condiciones (Li et al, J. Virol., 71:2988-2995 (1997)). Sin embargo, esto tiene desventajas, ya que el uso de proteasa puede dar como resultado efectos adversos, por ejemplo, la eliminación de epítomos neutralizantes.

- 5 También, Sapp y colaboradores demostraron que se podría conseguir el "desmontaje parcial" de las VLP del VPH-33 mediante un tratamiento con el agente reductor en solitario (DTT 20 mM). Sin embargo, no se determinó la descomposición de la VLP (Sapp et al, J. Gen. Virol., 76:2407-2412 (1995)).

10 Como se ha descrito anteriormente, el montaje de la cápsida del VPH requiere el plegado correcto de la proteína L1. Sin embargo, los factores adicionales significativos para la formulación y la estabilidad de las VLP no se han elucidado todavía. Con respecto a lo anterior, se sabe de forma general que el montaje de VLP se puede ver afectado por numerosos factores. Por ejemplo, los factores y las condiciones conocidas por afectar el montaje de otros virus incluyen, a modo de ejemplo: pH, fuerza iónica, modificaciones posteriores a la traducción de las proteínas de la cápsida, enlaces disulfuro, y enlaces de cationes divalentes, entre otros. Por ejemplo, la importancia de los enlaces de cationes, específicamente calcio, en el mantenimiento de la integridad del virion, se ha demostrado para el virus del poliovirus (Brady et al, J. Virol., 23:717-724 (1977)), y para el rotavirus (Gajardo et al, J. Virol., 71:2211-2216 (1997)). Análogamente, los enlaces disulfuro parecen ser significativos para estabilizar el virus del poliovirus (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, se sabe que factores como el pH y la fuerza iónica afectan la estabilidad de la cápsida del virus del poliovirus, afectando supuestamente a 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)). Análogamente, también se sabe que las modificaciones posteriores a la traducción de algunas proteínas de la cápsida vírica pueden afectar a la estabilidad y al montaje; por ejemplo, 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)). De esta forma, existen numerosos factores interrelacionados que pueden afectar a la estabilidad de la cápsida, el desmontaje y el remontaje, que varían ampliamente incluso para virus relacionados.

30 Por tanto, existe una necesidad en la técnica de elucidar los factores que afectan al desmontaje y remontaje de las VLP del virus del papiloma. Además, basado en lo anterior, existe una necesidad en la técnica de un método eficaz *in vitro* para desmontar y volver a montar VLP del virus del papiloma que dé como resultado VLP que tengan buena homogeneidad, estabilidad y propiedades inmunógenas, por ejemplo, las que estén presente en los epítomos conformacionales y, más especialmente, en los epítomos neutralizantes expresadas en la superficie de viriones del virus del papiloma natural intacto. Además, existe una necesidad significativa de métodos para desmontar y montar las VLP del virus del papiloma que eviten los problemas del desmontaje parcial de la VLP y que eviten el uso de la proteasa utilizada en los métodos de la técnica anterior para generar VLP del virus del papiloma.

### Objetos de la invención

- 40 De esta forma, es un objeto de la invención resolver los problemas de la técnica anterior.
- Más específicamente, es un objeto de la invención proporcionar un método novedoso para desmontar y volver a montar las VLP del virus del papiloma.
- 45 Aún más específicamente, es un objeto de la invención proporcionar un método novedoso para desmontar y volver a montar las VLP del virus del papiloma humano.
- Es también un objeto de la invención proporcionar un método que permita el desmontaje y remontaje cuantitativo de las VLP del virus del papiloma en grandes cantidades.
- 50 Es objeto de la invención de la invención proporcionar composiciones que comprenden VLP del virus del papiloma, preferentemente composiciones que comprenden VLP del virus del papiloma humano de calidad mejorada, por ejemplo, de homogeneidad, inmunogenicidad y/o estabilidad mejoradas.
- 55 Es objeto de la invención proporcionar un medio mejorado para purificar VLP mediante la incorporación del desmontaje/remontaje de VLP al proceso de purificación.
- Es un objeto adicional de la memoria descriptiva proporcionar un método para encapsular restos deseados en VLP del virus del papiloma, por ejemplo, agentes terapéuticos o diagnósticos.
- 60 Es otro objeto de la memoria descriptiva proporcionar VLP del virus del papiloma, preferentemente VLP del virus del papiloma humano, que contienen agentes diagnósticos o terapéuticos deseados, por ejemplo, agentes antineoplásicos o agentes antivirales.
- 65 Es otro objeto adicional de la memoria descriptiva generar "pseudoviriones" de tipos del virus VPH donde no están disponibles cantidades de viriones del VPH no están actualmente disponibles mediante la encapsulación de los componentes exógenos en las VLP del VPH construidas con las proteínas L1 y L1/L2 de dicho VPH del virus del

papiloma, en particular el ADN correspondiente al genoma de dicho VPH o fragmento del mismo, o un ADN que codifica un marcador seleccionable tal como la p-galactosidasa.

5 Es otro objeto adicionalm de la memoria descriptiva proporcionar un novedoso método para suministrar un resto deseado, por ejemplo, un ADN, a las células deseada donde el vehículo de administración de dicho resto, por ejemplo, ADN de sentido directo o de sentido contrario, comprende una VLP del virus del papiloma.

10 Sigue siendo otro objeto de la presente memoria descriptiva utilizar pseudoviriones basados en VLP del HPH en un ensayo *in vitro* para analizar la eficacia de potenciales vacunas del VPH que analizan la capacidad de los anticuerpos neutralizantes para inhibir la inserción de un ADN encapsulado en el mismo en células normalmente infectadas por dicho VPH.

### Breve descripción de la invención

15 Por tanto, la invención se refiere en general a un método novedoso para desmontar y volver a montar las VLP del virus del papiloma, preferentemente las VLP del virus del papiloma humano *in vitro*.

Más específicamente, la presente invención proporciona un método para producir partículas análogas a virus (VLP) del virus del papiloma humano (VPH), que comprende:

- 20 (i) purificar una proteína L1 del VPH expresada de forma recombinante desmontada en presencia de al menos un agente reductor de sulfhidrilo que mantiene dicha proteína L1 del VPH expresada de forma recombinante en una forma desmontada; y
- 25 (ii) montar dicha proteína L1 del VPH expresada de forma recombinante en partículas análogas a virus (VLP) del virus del papiloma humano mediante la eliminación u oxidación de dicho al menos un agente reductor.

Como se ha descrito anteriormente, las VLP del virus del papiloma están constituidas principalmente de una proteína estructural L1, que es estable en forma de capsómeros pentaméricos o cápsidas compuestas por 72 capsómeros. Dichas VLP pueden también comprender la proteína L2. En particular, mediante la selección cuidadosa de las condiciones experimentales, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el desmontaje cuantitativos de las VLP del virus del papiloma (casi en su totalidad hasta el nivel de los capsómeros o inferior) y el posterior remontaje, se pueden conseguir de forma consistente mediante la exposición prolongada de las VLP a una solución que comprende una concentración elevada de al menos un agente reductor de sulfhidrilo, preferentemente contenido en tampones de fuerza iónica de moderada a baja. Específicamente, el método sujeto da como resultado composiciones que contienen VLP remontadas de muy alta homogeneidad, que predominantemente contienen partículas en el intervalo de VLP de tamaño completo, con un promedio de  $56,5 \pm 7.0$  nm (n=15) con muy poca cantidad de VLP ensambladas parcialmente o complejos de tamaño inferior. Los rendimientos son también muy altos, es decir, cuantitativos, con un promedio de 80-90 % en términos de la proteína L1 total desde el material de partida a las VLP remontadas en condiciones de desmontaje óptimas. Además, esencialmente, todos los capsómeros anteriormente disociados se vuelven a montar para producir VLP solubles y filtrables de tamaño completo.

Se ha descubierto inesperadamente que el uso de tales condiciones da como resultado composiciones de VLP del virus del papiloma de homogeneidad potenciada (con respecto al material de partida de VLP y a las composiciones de VLP disponibles), es decir, composiciones homogéneas constituidas casi completamente por VLP del virus del papiloma que tienen 55 nm, 150 S. Además, se ha demostrado que estas VLP homogéneas tienen epítomos conformacionales neutralizantes del VPH, un requisito previo de una vacuna profiláctica eficaz basada en VLP del VPH. También, los inventores han descubierto sorprendentemente que los quelantes no potencian el desmontaje de las VLP, y además pueden inhibir el desmontaje de capsómeros en VLP. Como se describe con más detalle *infra*, estos hallazgos fueron sorprendentes porque un papovirus relacionado, un poliomavirus, ha demostrado que la exposición a bajos niveles de agente reductor de sulfhidrilo y quelación de los iones calcio fueron esenciales para el desmontaje del virión. Por el contrario, dichas condiciones solamente son ligeramente eficaces para el desmontaje de las VLP del papiloma.

55 Como se indica, se ha descubierto que el capsómero del virus del papiloma y las composiciones de VLP, producidas de acuerdo con la invención, presentan epítomos específicos de la estructura (conformacionales), en particular epítomos neutralizantes, que aparecen sobre la superficie de los viriones intactos del virus del papiloma. Se ha demostrado tanto mediante su reactividad con anticuerpos neutralizantes y anticuerpos dirigidos contra L1 del virus del papiloma específicos de estructura en un ensayo ELISA, y por su capacidad de inducir la síntesis de anticuerpos que neutralizan la infección por el virus del papiloma en un ensayo de infección RT-PCT. Por tanto, son muy adecuados para su uso como agentes profilácticos para prevenir la infección por el VP y con fines diagnósticos. Además, los métodos sujetos para el desmontaje y remontaje de VLP se pueden aplicar para diferentes grados de pureza de VLP. Esto permite el desmontaje de mezclas brutas de VLP, la purificación de los componentes solubles más pequeños de VLP (que es más sencillo gracias a su tamaño mucho menor), seguido por el remontaje en la etapa deseada del proceso de purificación.

También, como se describe con más detalle *infra*, los métodos sujeto proporcionan adicionalmente la introducción de restos deseados, por ejemplo, ADN, proteínas, péptidos, hormonas, radionucleidos, fármacos antineoplásicos y agentes antivíricos en las VLP durante el remontaje. Esto es ventajoso ya que dichas VLP se pueden utilizar como vehículos de suministro (para la inserción de restos deseados en las células) y como "pseudoviriones" para evaluar la eficacia profiláctica de las vacunas del virus del papiloma.

Los presentes inventores teorizan que el desmontaje de la VLP del virus del papiloma requiere una exposición prolongada hasta niveles muy elevados de agentes reductores debido a la presencia de enlaces disulfuro estabilizantes, que probablemente están muy profundos y son inaccesibles, y dicha exposición de estos enlaces a los disolventes debido a las fluctuaciones estructural locales son muy infrecuentes. (Este fenómeno se describe con mayor detalle en la solicitud con n.º de serie 08/888.050, presentada el 3 de julio de 1997). Aparentemente, tras una exposición prolongada a concentraciones elevadas de agente reductor y a una fuerza iónica de moderada a baja, estos enlaces quedan accesibles con el tiempo.

15 **Definiciones:**

Proteína principal de la cápsida, o proteína L1

20 Esto se refiere a la proteína estructural del virus del papiloma (VP) que constituye la parte principal de la estructura de la cápsida del VP. Esta proteína se ha notificado en la preparación de vacunas del VPH y como agente diagnóstico.

Proteína secundaria de la cápsida, o proteína L2

25 Esto se refiere a la proteína estructural del virus del papiloma que constituye una parte menor de la estructura de la cápsida vírica del VP.

Partículas análogas a virus o VLP

30 Esto se refiere a las estructuras análogas a cápsidas que son el resultado de la expresión y el montaje de una secuencia de ADN de la L1 del virus del papiloma, sola o combinada con una secuencia de ADN de la L2. Las VLP son morfológica y antigénicamente similares a los viriones auténticos. Las VLP se pueden producir *in vivo*, en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, células hospedadoras de mamífero y de insecto, o se pueden formar espontáneamente tras la purificación de proteínas L1 recombinantes.

35 Pseudovirión

40 Esto se refiere a las VLP que contienen compuestos marcadores exógenos, compuestos de proteínas L1 o L1 y L2 de un tipo de VP específico. Los pseudoviriones se pueden utilizar para someter a ensayo la eficacia de las sustancias, como los anticuerpos, para bloquear la unión específica al virus y/o la recaptación en células diana, en los casos donde no está disponible un virus auténtico.

Proteína L1 correctamente plegada

45 Esto se refiere a la proteína L1 (tanto monomérica, en la forma de oligómeros pequeños (dímeros-tetrámeros) o capsómeros) que está en una conformación adecuada para su remontaje en VLP y que retiene epítomos presentes en cápsidas víricas o VLP.

50 Capsómeros

Esto se refiere a una configuración oligomérica de la proteína L1 que está constituido por pentámeros de L1.

Cápsidas

55 Esto se refiere a la parte estructural del virus del papiloma que está compuesto de capsómeros. Más específicamente, está constituido por setenta y dos capsómeros en una estructura de icosaedro T=7.

Epítomo conformacional L1 del VPH

60 Esto se refiere a un epítomo expresado sobre la superficie de la proteína L1 correctamente plegada, que también se expresa por una proteína L1 de un tipo natural correspondiente del VPH. Los expertos en la materia aceptan normalmente que la presentación de epítomos conformacionales es fundamental para la eficacia (como agentes profilácticos y diagnósticos) de inmunógenos de la proteína L1 de VPH.

65 Epítomo conformacional L1 del VPH neutralizante

Esto se refiere a un epítipo expresado sobre la superficie de la proteína L1 plegada correctamente, que también se expresa por una proteína L1 de un correspondiente VPH infeccioso no natural, y que desencadena anticuerpos neutralizantes. Los expertos en la materia aceptan bien que la presentación de epítipos conformacionales neutralizantes es fundamental para la eficacia (como agentes tanto como profilácticos como diagnósticos) de los  
 5 inmunógenos de la proteína L1 del VPH.

#### Anticuerpo conformacional

Esto se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo expresado en la proteína L1 plegada  
 10 correctamente pero no en la proteína L1 desnaturalizada.

#### Solución de agente reductor de alta concentración

Esto se refiere a una solución que contiene una cantidad de al menos un agente reductor de sulfhidrilo, por ejemplo,  
 15 glutatión,  $\beta$ -mercaptoetanol o ditioneitol que proporciona al menos un 70 % de desmontaje de las VLP del virus del papiloma, cuando las VLP se ponen en contacto entre ellas durante periodos de tiempo prolongados, al menos 2 horas, y más preferentemente al menos 16 horas. La concentración del agente reductor puede variar dependiendo del agente reductor concreto. En el caso del  $\beta$ -mercaptoetanol, esta cantidad será preferentemente al menos 1 % por peso, más preferentemente al menos 3-5 % en peso. En el caso del ditioneitol, la cantidad será preferentemente  
 20 al menos aproximadamente 100 mM.

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

Esto se refiere al tiempo en que las VLP están en contacto con la solución de agente reductor de alta concentración  
 25 que es suficiente para proporcionar al menos un 70 % del desmontaje de las VLP en capsómeros. Preferentemente, dicha exposición prolongada dará como resultado 70-90 % de desmontaje y, óptimamente, prácticamente el desmontaje total de VLP. Este tiempo variará para los diferentes tipos de VP, y también puede depender de las células que expresan las VLP (material de partida), grado de pureza (presencia o ausencia de agregados), pH, y fuerza iónica. Adicionalmente, las VLP formadas a partir de proteína L1 alterada o químicamente mutada, por  
 30 ejemplo, una proteína L1 truncada en su extremo C, puede desmontarse en condiciones más suaves. En general, esta exposición será de al menos 2 horas (en el caso de las VLP de VPH-16Tr), y más típicamente más prolongada, es decir, al menos de 12 horas, más preferentemente al menos 16 horas (en el caso de las VLP de VPH-11).

#### **Descripción detallada de las figuras**

35 Figura 1: Análisis SDS/PAGE de la proteína L1 de VPH-11 purificada. La proteína se mezcló con tampón de preparación de muestra en ausencia (hilera 1) o presencia (hilera 2) de DTT 2 mM t se sometió a ebullición durante 2 minutos antes de la electroforesis en gel. A la izquierda se muestran las posiciones a las que migraron los patrones de peso (en Da  $\times 10^{-3}$ ).

40 Figura 2: Análisis de cojines de sacarosa al 30 % del desmontaje de VLP de VPH-11. Las preparaciones de VPH-11 se trataron a 4°C como se describe en el texto, y se tomaron las muestras en la parte superior (T) o inferior (B) del cojín de sacarosa antes de la electroforesis en gel. Grupo 1, material de partida purificado sin tratar de VLP de VPH-11 en PBS. Grupo 2, VLP incubadas con un 5 % de  $\beta$ ME durante 16 horas. Grupo 3, VLP  
 45 incubadas con un 5 % de  $\beta$ ME durante 1 hora. Grupo 4, VLP incubadas con un 2 % de  $\beta$ ME durante 16 horas. Grupo 5, VLP incubadas con un 0,5 % de  $\beta$ ME durante 16 horas. Grupo 6, VLP incubadas con DTT 10 mM, EDTA 5 mM durante 16 horas.

Figura 3: Análisis en gradiente lineal de sacarosa 5-20 % de VLP de VPH-11 desmontadas. Las VLP en PBS se  
 50 incubaron con un 5 % de  $\beta$ ME (a), o  $\text{NaHCO}_3$  200 mM, pH 9,6(b) durante 16 horas a 4°C y a continuación se centrifugaron en un gradiente lineal de sacarosa 5-20 % como se describe en el texto. El gradiente se recogió en 25 fracciones (0,5 ml), y el aglomerado (P) se resuspendió en 0,5 ml de PBS. Se muestra una inmunotransferencia que demuestra la posición de la proteína L1 a través del gradiente. También se indican las posiciones de los picos a las que migran las posiciones de los patrones de sedimentación cuando se analizan con gradientes diferenciados.

Figura 4: Análisis en gradiente lineal de sacarosa 10-65 % de las VLP de VPH-11 en diversos estados de  
 55 montaje. Una alícuota de material de partida de VLP purificado (a) se incubó con un 5 % de  $\beta$ ME durante 16 hras a 4°C (b). Una parte de las VLP tratadas con  $\beta$ ME se volvieron a montar mediante diálisis en PBS-0,5 NaCl para eliminar el agente reductor (c). A continuación, las muestras se centrifugaron en gradientes de sacarosa 10-65 % lineales como se describe en el texto. Cada gradiente se recogió en 12 fracciones (1 ml), y el aglomerado (P) se resuspendió en 1 ml de PBS. Se muestran las inmunotransferencias que demuestran las posiciones a las que  
 60 migra la proteína L1 en los diferentes gradientes. También se indican las posiciones de los picos a las que migran las posiciones de los patrones de sedimentación, como en la Fig. 3.

Figura 5: Micrografías electrónicas de las VLP de VPH-11 en diversos estados de montaje. Las VLP, tratadas  
 65 como se ha descrito, se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2 %, se aplicaron a rejillas, y se fotografiaron con aumentos de 15-25,000 veces. a, material de partida de VLP purificado, b, VLP desmontadas hasta el nivel de capsómeros por incubación con un 5 % de  $\beta$ ME durante 16 horas t 4°C. c, VLP remontadas a partir de las VLP

desmontadas mediante diálisis en PBS-0,5 NaCl, d, la región 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 desmontada con anticuerpos monoclonales específicos de la estructura de VPH-11. Material de partida de VLP de L1 de VPH11 (A), VLP desmontadas mediante tratamiento con un 5 % de  $\beta$ ME tanto sin (B) como con (C) diálisis posterior en PBS-0,5 M NaCl para eliminar el agente reductor, y las VLP desmontadas en presencia de carbonato 200 mM, pH 9,6 y a continuación se dializaron en PBS-0,5 M NaCl (D) donde se unieron a los pocillos de las placas de microvaloración. Los anticuerpos monoclonales específicos de la estructura de VPH-11, H11.F1 (neutralizante de VPH-11;  $\square$ ) y H11.A3 (no neutralizante de VPH-11;  $\bullet$ ) se analizaron para determinar la inmunoreactividad respecto a los antígenos unidos en un ELISA como se describe en la sección Materiales y métodos. La reactividad con el anticuerpo monoclonal AU1 ( $\blacksquare$ ), que reconoce un epítipo lineal encontrado en L1 de VPH-11, se utilizó como control para demostrar la unión del antígeno a los pocillos de microvaloración.

Figura 7: Comparación de la capacidad del antisuero sensibilizados contra las VLP de VPH-11 iniciales purificadas, y las VLP remontadas, para neutralizar el virus VPH-11. El suero anti-VPH-11 se incubó con viriones de VPH-11 durante 60 min a 37°C antes de añadir las células HaCaT. Alternativamente, los viriones se añadieron a las células sin preincubación con el suero. Seis días después de la infección, las células se recogieron, y se extrajo el ARN total. Se utilizó un diez por ciento del ARN total para la transcripción inversa, y un diez por ciento del ADNc resultante se utilizó seguidamente como molde de la PCR anidada usando cebadores específicos del mensaje E1A/E4 de VPH-11 tras corte y empalme. Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 2 %. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se examinaron con luz UV para determinar la presencia de la banda de E1A/E4 a -0,6 kb (a). La amplificación mediante PCR de la  $\beta$ -actina se realizó para todas las muestras de ADNc como control interno (b). El tamaño esperado de la banda de la  $\beta$ -actina es -0,6 kb. La hilera S contiene marcadores del tamaño molecular. La hilera C representa las reacciones realizadas con ARN de células incubadas sin virus, y la hilera V representa las células incubadas con virus que no se preincubaron con suero. Como se esperaba, la banda E1A/E4 se detectó en las células infectadas por virus, pero no en las células no infectadas. Las siguientes hileras contenían productos de la PCR procedentes de células infectadas con el virus que se habían incubados con diluciones en serie  $\log_{10}$  de antisuero anti-VPH-11 ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ ) sensibilizado contra las VLP iniciales purificadas VPH-11 y las VLP remontadas, como se indica.

Figura 8: Comparación SDS/Page de las VLP de VPH-16<sub>Tr</sub> en estados montado (- $\beta$ ME) y desmontado (+ $\beta$ ME, Ciclo 2), lo que indica la mayor pureza de las VLP purificadas en estado desmontado. La posición a la que migra la proteína L1 de VPH-16<sub>Tr</sub> se indica mediante la flecha.

Figura 9: Análisis en gradiente lineal de sacarosa 5-20 % de las VLP de VPH-16<sub>Tr</sub> desmontadas. Las VLP+ $\beta$ ME del ciclo 2 finales purificadas (véase la Tabla 3) en PBS se incubaron con un 4 % de  $\beta$ ME durante 16 horas a 4°C y a continuación se centrifugaron en un gradiente lineal de sacarosa 5-20 % como se describe en la sección de Métodos. El gradiente se recogió en 25 fracciones (0,5 ml), y el aglomerado (P) se resuspendió en 0,5 ml de PBS. Se muestra una inmunotransferencia, sondeada con el anticuerpo monoclonal específico de VPH-16, 16-E, que demuestra la posición de la proteína L1 a través del gradiente. También se indican las posiciones de los picos a las que migran las posiciones de los patrones de sedimentación cuando se analizan con gradientes diferenciados.

Figura 10: Análisis en gradiente lineal de sacarosa 10-65 % de las VLP de VPH-16<sub>Tr</sub> en diversos estados de montaje. Una alícuota de (a) material de partida de VLP purificado (+ $\beta$ ME Ciclo 2; véase la Tabla 3) se incubó con un 4 % de  $\beta$ ME durante 16 horas a 4°C (b). Una parte de las VLP tratadas con  $\beta$ ME se volvieron a montar mediante diálisis en PBS-0,5 NaCl para eliminar el agente reductor (c). A continuación, las muestras se centrifugaron en gradientes de sacarosa 10-65 % lineales como se describe en el texto. Cada gradiente se recogió en 12 fracciones (1 ml), y el aglomerado (P) se resuspendió en 1 ml de PBS. Se muestran las inmunotransferencias, sondeadas con el anticuerpo monoclonal específico de VPH-16, 16-E, que demuestra las posiciones a las que migra la proteína L1 en los diferentes gradientes. También se indican las posiciones de los picos a las que migran las posiciones de los patrones de sedimentación, como en la Fig. 9.

## 50 Descripción detallada de la invención

Como se ha descrito, la presente invención se refiere de forma general a un método novedoso que proporciona un desmontaje muy eficaz de las VLP del virus del papiloma, es decir, un desmontaje de al menos un 70 %, más preferentemente un desmontaje del 70-90 %, y lo más preferiblemente, un desmontaje total de las VLP, que comprende una exposición prolongada de las VLP del virus del papiloma que comprenden L1 o una combinación de las proteínas L1 y L2 a una solución de agente reductor de sulfhidrilo de alta concentración. En general, la concentración del agente reductor será de al menos un 1 % en peso, y más preferentemente de aproximadamente un 3-5 % en peso, donde la solución que contiene agente reductor tiene preferentemente una fuerza iónica que es como máximo de aproximadamente 0,5 y preferentemente menor.

Sin embargo, las concentraciones del agente reductor y la fuerza iónica pueden variar para los diferentes tipos del virus del papiloma, las células hospedadoras de las que se obtienen, las formas mutadas y/o químicamente alteradas de la proteína L1, y la pureza. Más específicamente, los presentes inventores han elucidado las condiciones para el desmontaje máximo de las VLP purificadas *in vitro*, que proporciona un remontaje posterior eficaz. Se ha descubierto que una incubación prolongada de las VLP del virus del papiloma con concentraciones

relativamente elevadas de agentes reductores con fuerzas iónicas que son como máximo de 0,5 M, y más preferentemente cercanas a una fuerza iónica fisiológica o inferiores, es a la vez necesaria y suficiente para generar capsómeros homogéneos solubles a partir de las VLP purificadas. Además, se ha descubierto que tras la eliminación o, alternativamente, mediante oxidación del agente reductor, se obtiene una población definida de las VLP intactas adecuadamente dimensionadas.

Esto se ha demostrado de manera particular usando VLP de VPH-11 producidas en un sistema de baculovirus/célula de insecto, es decir, en células de *Trichoplusia ni* (High Five®) infectadas con un baculovirus recombinante que contiene la totalidad de la secuencia del ADN de la L1 de VPH-11. Sin embargo, basándose en estos resultados, es razonable concluir que se lograrán resultados similares con las VLP de virus del papiloma producidas a partir de otros tipos y especies, en particular otros tipos de virus del papiloma humano. Esto es algo razonable, ya que numerosas proteínas L1 del virus del papiloma han demostrado producir VLP cuando se expresan en sistemas de vectores de expresión recombinante.

Análogamente, es razonable esperar que se logren resultados similares usando las VLP del virus del papiloma comprendidas por una combinación de las proteínas L1 y L2, ya que parecen ser virtualmente idénticas a las VLP fabricadas solamente con proteínas L1.

[Sin embargo, suponiendo que la L2 tiene un papel estabilizante significativo, los presentes inventores reconocen que es posible que el desmontaje necesite el uso de mayores concentraciones de agente reductor, una exposición más prolongada al mismo, pH elevado y/o reducida fuerza iónica durante el desmontaje.] Además, se espera que los métodos sujetos sean adecuados para el desmontaje/montaje de las VLP obtenidas a partir de cualquier sistema de células hospedadoras que den como resultado la producción de las VLP del virus del papiloma. Aunque los solicitantes reconocen que existen algunas diferencias entre las células hospedadoras, como se ha descrito *supra*, se ha notificado que muchas células hospedadoras expresan las VLP del las VLP en forma de las VLP.

En general, el material de partida de VLP deseado se producirá en un sistema de célula hospedadora adecuado, por ejemplo, un sistema de baculovirus/célula de insecto, del que se extraerá por métodos conocidos. La técnica de extracción dependerá de factores tales como las células hospedadoras específicas utilizadas, la concentración, si permanece intracelular o se secreta al medio, entre otros factores.

El desmontaje de las VLP se puede realizar a diferentes niveles de pureza de las VLP. Cuando se realiza junto con la purificación, las VLP se extraen de las células, se desmontan, se purifican con técnicas convencionales, y se vuelven a montar con el grado deseado de pureza. En los casos en que las VLP se utilizan para empaquetar componentes exógenos, o cuando el desmontaje/remontaje se realiza para mejorar la homogeneidad del producto final, las VLP utilizadas serán de una pureza bastante elevada. En estos casos, las VLP utilizadas en el desmontaje serán preferentemente al menos un 10-30 % en peso, más preferentemente un 50 % en peso, y lo más preferentemente al menos un 70-90 % en peso. Los métodos para determinar la pureza de las VLP son bien conocidos, e incluyen métodos desitométricos SDS-PAGE.

Como se describe detalladamente *infra* en la sección de materiales y métodos, la presente invención desarrolla un ensayo de cribado rápido para el estudio del desmontaje de las VLP que utiliza un sistema en gradiente de sacarosa. En este sistema, el aglomerado con las VLP intactas pasa por un cojín de sacarosa al 30 %, mientras que los capsómeros no agregados, los oligómeros de L1 más pequeños, o los monómeros de L1, se quedan en la parte superior del cojín. De esta forma, este método de ensayo es beneficioso ya que facilita la identificación precisa de las condiciones que dan como resultado el máximo desmontaje de las VLP.

En general, se ha descubierto que el desmontaje máximo de las VLP requiere una exposición prolongada de las VLP no agregadas a una solución que contiene una concentración elevada de un agente reductor de sulfhidrilo. Como se ha explicado anteriormente, una exposición prolongada es la duración suficiente para dar como resultado al menos un 70 % de desmontaje de las VLP, más preferentemente un 70-90 % de desmontaje de las VLP, y de forma virtualmente ideal, el desmontaje completo de las VLP. En el caso de las VLP de L1 de VPH-11 recombinante producidas en el sistema de células de insecto ilustrado, el desmontaje máximo se produjo transcurridas aproximadamente 16 horas a 4°C (usando una solución que contenía un 5 % en peso de β-mercaptoetanol). Sin embargo, dichos tiempos de exposición se pueden reducir usando otros materiales de partida de las VLP, diferentes condiciones de pH, mayores concentraciones del agente reductor, y menores fuerzas iónicas. Por ejemplo, se ha descubierto [no se muestran los resultados] que se puede realizar un desmontaje sustancial de las VLP formadas mediante una forma truncada en el extremo C de la proteína L1 de VPH-16 mediante la exposición de dichas VLP a una solución de β-mercaptoetanol (4 %) tras aproximadamente 2 horas a 4°C.

El método de desmontaje de las VLP sujeto ha demostrado ser eficaz usando β-mercaptoetanol y ditiotreitól como agentes reductores. Sin embargo, se espera que otros agentes reductores conocidos proporcionen resultados similares. Los ejemplos de agentes reductores adecuados útiles en la invención incluyen glutatión, β-mercaptoetanol, ditiotreitól, ditioeritritól, cisteína, sulfuro de hidrógeno, y mezclas de los mismos.

Como se indica, el presente método pone en contacto las VLP con una solución que tiene una concentración

elevada de un agente reductor de sulfhidrilo. En el presente documento, esto se define como una concentración de agente reductor que da como resultado un desmontaje sustancial de las VLP, es decir, al menos un 70 %, preferentemente al menos un 70-90 %, y más preferentemente un desmontaje virtualmente total de las VLP, tras una exposición prolongada.

5 Estas concentraciones elevadas del agente reductor variarán dependiendo de los agentes reductores adecuados, o combinación de los mismos. En el caso del  $\beta$ -mercaptoetanol, se ha descubierto que una concentración de al menos aproximadamente un 5 % en peso (713 mM) da como resultado un desmontaje óptimo de las VLP de la L1 del VPH-11 a una fuerza iónica fisiológica. Concentraciones inferiores de agente reductor y periodos de exposición reducidos  
10 dan como resultado un desmontaje de VLP menos eficaz. Por ejemplo, se ha descubierto que soluciones de  $\beta$ -mercaptoetanol al 4 % también proporcionan un desmontaje eficaz (al menos un 70 %).

Se ha descubierto también que la fuerza iónica es un parámetro importante en el método de desmontaje. Preferentemente, el desmontaje se realizará con una solución que tenga una fuerza iónica que sea como máximo de 0,5, y preferentemente menor, más preferentemente el desmontaje se realizará a una fuerza iónica  
15 aproximadamente "fisiológica" (es decir, 0,15 NaCl) o inferior. Se ha descubierto que fuerzas iónicas mayores vuelven menos eficaz el método de desmontaje de las VLP. En general, la fuerza iónica será como máximo de aproximadamente 0,5, más preferentemente de como máximo aproximadamente 0,25, y lo más preferible como máximo de aproximadamente 0,15.

20 También se ha descubierto que la presencia de agregación de las VLP tiene efectos negativos sobre el desmontaje. Este efecto se puede evitar por la eliminación del material agregado, o potencialmente se puede obviar mediante una exposición más prolongada de las VLP a la solución de agente reductor de concentración elevada. Esto ocurre probablemente debido a que los enlaces disulfuro están muy profundos y por tanto son inaccesibles para el agente reductor cuando hay agregados, evitando de esta forma el desmontaje.

Análogamente, como se ha comentado, se ha descubierto sorprendentemente que los quelantes, incluso en altas concentraciones, no tienen un efecto significativo sobre el desmontaje de las VLP del VPH-11. Esto se demostró usando EGTA y EDTA, ambos quelantes bien conocidos, solos y en combinación con ditioneitol. Como se ha  
30 descrito anteriormente, esto es sorprendente, ya que se había notificado que los agentes quelantes eran necesarios en el desmontaje de las VLP de un papovirus.

Adicionalmente, se ha descubierto que el tampón carbonato ( $\text{NaHCO}_3$  0,2 M pH 9,6) produce un desmontaje significativo de las VLP de VPH-11. Sin embargo, a diferencia del desmontaje inducido por una exposición  
35 prolongada a agentes reductores de sulfhidrilo, no fue posible volver a montar las VLP tratadas con carbonato. Se teoriza que el tratamiento con carbonato desnaturaliza parcialmente la proteína L1. Esto demuestra que solamente aquellos métodos (tales como la exposición prolongada a concentraciones eficaces de agentes reductores de sulfhidrilo) que desmontan las VLP manteniendo al mismo tiempo la estructura de la proteína L1 plegada correctamente producirá material que sea adecuado para volver a montarse en VLP solubles de tamaño completo.

40 Como se indica el desmontaje sujeto de las VLP de VPH-11 da como resultado capsómeros de gran homogeneidad que presentan epítomos conformacionales neutralizantes, como se demuestra por su reactividad con anticuerpos monoclonales conformacionales y neutralizantes producidos contra el virus del papiloma particular (se ha ilustrado el VPH-11). Además, en condiciones óptimas, el método sujeto da como resultado una composición donde las VLP  
45 parecen estar completamente descompuestas en capsómeros. Inversamente, el desmontaje sujeto de las VLP de VPH-16<sub>Tr</sub> parece dar como resultado una mezcla de capsómeros, oligómeros más pequeños de L1 y monómeros de L1. Sin embargo, esta mezcla de oligómeros de L1 es también capaz de volverse a montar de forma cuantitativa. Esto indica que el método sujeto proporciona la proteína L1 plegada correctamente, en la forma de capsómeros, oligómeros más pequeños de L1 o monómeros de L1, que es adecuado para volver a montar las VLP.

50 Como se ha descrito, una ventaja particular de la invención es que estos capsómeros se pueden volver a montar cuantitativamente en las VLP simplemente por eliminación de la solución del agente reductor. La eliminación del agente reductor se puede realizar por diferentes métodos, por ejemplo, diálisis o cromatografía en columna. Alternativamente, la adición de un exceso de oxidantes puede promover potencialmente la formación posterior de los  
55 enlaces disulfuro adecuados, conduciendo al remontaje de las VLP. Como se ha descrito anteriormente, el remontaje se ve afectado por la integridad estructural del material de partida de la proteína L1 plegada correctamente. También, la solubilidad del material de partida afecta el remontaje, ya que el material agregado no se vuelve a montar cuantitativamente.

60 En general, el remontaje se llevará a cabo por eliminación del agente reductor de sulfhidrilo o por adición de oxidantes y exposición del material de partida de proteína L1 plegada correctamente a condiciones de fuerza iónica mayor, por ejemplo, al menos 0,5 o mayor. Mayores concentraciones de sal actúan estabilizando las VLP. Sin embargo, la adición de agentes quelantes tiene el efecto contrario, es decir, inhibe moderadamente el remontaje.

65 Sorprendentemente, dicho remontaje da como resultado VLP que son mucho más homogéneas en lo que respecta al tamaño de partícula que el material de partida de VLP. Esto se ha demostrado por comparación con el material de

partida de VLP y el producto de VLP vuelto a montar en gradientes de sacarosa 10-65 % lineales, y mediante el examen con el microscopio electrónico. Predominantemente, se detectaron partículas en el intervalo de las VLP de tamaño completo, con un promedio de  $56,5 \pm 7,0$  nm, con muy pocas VLP parcialmente montadas, o complejos de tamaño inferior. También, los rendimientos son muy altos, con un promedio de aproximadamente 80-90 % en términos de la relación de proteína L1 total desde el material de partida a las VLP remontadas usando condiciones de remontaje óptimas. Esencialmente, todo el material de partida desmontado parece reformularse en VLP solubles y filtrables de tamaño completo. Igualmente, estas VLP muestran epítomos conformacionales neutralizantes que aparecen en la superficie de los viriones auténticos del virus del papiloma y desencadenan anticuerpos neutralizantes potencialmente como el material de partida de VLP.

Aunque estos resultados son novedosos e inesperados, lo que no se esperaba, basándose en las enseñanzas de la solicitud, que un experto en la materia pudiera conseguir rendimientos de VLP incluso mayores variando la concentración de proteínas, la fuerza iónica y/o la cinética.

Como se ha descrito, la presente memoria descriptiva proporciona además métodos para producir las VLP del virus del papiloma en cuyo interior se ha encapsulado un resto o restos deseados. Esto se llevará a cabo generalmente mediante las siguientes etapas:

- (i) obtener las VLP de un virus del papiloma deseado, que están constituidas por la proteína L1 o una combinación de las proteínas L1 y L2;
- (ii) desmontar dichas VLP poniendo en contacto dichas VLP con una solución que contiene una alta concentración de un agente reductor de sulfhidrilo que tiene una fuerza iónica que es como máximo 0,5;
- (iii) poner en contacto las VLP desmontadas con una solución que contiene un resto a encapsular en su interior, y que opcionalmente también contiene la proteína L2 purificada (por ejemplo, si las VLP desmontadas no comprenden la proteína L2); y
- (iv) volver a montar dichas VLP desmontadas por eliminación del agente reductor de sulfhidrilo o por adición de un exceso de oxidante, produciendo de esta forma las VLP que contienen el resto o restos deseados.

Las etapas de desmontaje y montaje se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente, es decir el desmontaje se realiza mediante el uso de altas concentraciones agentes reductores de sulfhidrilo, típicamente al menos 1 % en peso, o mayores, y durante periodos prolongados, es decir, al menos 2 horas, y típicamente más tiempo, por ejemplo, al menos 16 horas. Como se ha descrito, el tiempo de exposición y la concentración del agente reductor se ven afectados por el tipo de VLP del virus del papiloma, el sistema de célula hospedadora donde se producen, las mutaciones en la proteína L1 (por ejemplo, truncamientos en el extremo C), nivel de pureza, si hay agregados presentes, y potencialmente si las VLP comprenden L1 o una combinación de L1 y L2. El remontaje se produce tras la eliminación o la oxidación del agente reductor de sulfhidrilo.

Como se ha descrito anteriormente, aunque es razonable suponer que las VLP que comprenden L1 y L2 se desmontarán en condiciones similares a las VLP basadas en L1, la proteína L2 puede tener una función de estabilización. De esta forma, el desmontaje de las VLP que comprenden L1 y L2 puede requerir potencialmente mayores concentraciones de agente reductor, tiempos de exposición más prolongados, una fuerza iónica reducida, un pH elevado, o una combinación de los mismos. Alternativamente, las VLP constituidas completamente por proteínas L1 del VP se pueden desmontar como se enseña en el presente documento, y la proteína L2 purificada (producida por métodos recombinantes) se puede añadir durante la etapa de remontado.

Los restos que se pueden encapsular en las VLP incluyen restos terapéuticos y diagnósticos, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos, radionucleidos, hormonas, péptidos, agentes antivíricos, agentes antitumorales, agentes moduladores del crecimiento celular, inhibidores del crecimiento celular, citoquinas, antígenos, toxinas, etc.

Las VLP sujeto, que contienen un resto deseado encapsulado en su interior, tras su administración a un hospedador deseado, preferiblemente humano, deberán capturarse por células normalmente infectadas por el virus del papiloma concreto, por ejemplo, células epiteliales, queratinocitos, etc., proporcionando de esta forma la internalización potencial de dicho resto encapsulado en el interior de dichas células. Esto puede facilitar el uso de las VLP sujeto para terapia (en contraposición a su uso profiláctico) porque posibilita la administración de un agente terapéutico a un sitio celular deseado, por ejemplo, un sitio de cáncer de cuello de útero. Dado el fastidio que suponen los VP en general, esto puede proporcionar un medio muy selectivo para administrar restos deseados a células diana. Por ejemplo, puede proporcionar un medio de administración de secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, un ADN que codifica un polipéptido terapéutico, o una secuencia de sentido contrario.

El resto o restos encapsulados, por supuesto, no deben afectar negativamente el montaje o la estabilidad de las VLP. Esto se puede determinar produciendo VLP que contienen el resto deseado y evaluando sus efectos, de existir, sobre el montaje y/o la estabilidad de las VLP.

En el caso de los ADN o ARN, la secuencia de ácido nucleico encapsulada puede tener hasta 8 kilobases, el tamaño del genoma del VP. Sin embargo, típicamente, las secuencias encapsuladas serán más pequeñas, por ejemplo, de aproximadamente 1-2 kilobases. Típicamente, estos ADN codificarán un polipéptido deseado, por ejemplo, un

polipéptido terapéutico, tal como una enzima, hormona, factor de crecimiento de tipo insulina, etc. Esta secuencia posteriormente estará unida operativamente a secuencias que faciliten la expresión de la misma en las células hospedadoras diana.

5 Otra aplicación de las VLP que contienen ADN encapsulados es como "pseudoviriones". A este respecto, numerosos virus del papiloma, incluyendo los implicados en enfermedades humanas, son raros, no se pueden propagar fácilmente *in vitro* y no se pueden purificar fácilmente a partir de una fuente de células humanas en cantidades que permitan su uso en ensayos de neutralización de anticuerpos. Esto es un problema, ya que evita o dificulta evaluar la factibilidad de las vacunas o los compuestos terapéuticos para la protección contra estos virus VPH específicos.  
10 Los ejemplos de tipos de VPH para los que no hay existencias disponibles incluyen VPH31, 33, 35, y 45.

Los métodos de la presente memoria descriptiva deberían eliminar, o al menos reducir, estos problemas. Esencialmente, los "pseudoviriones" estarán contruidos de acuerdo con aquellos virus que comprenden las VLP que están constituidas por la proteína L1 o una combinación de proteínas L1 y L2 del VP concreto, y posteriormente se ha encapsulado en su interior una parte del genoma de dicho virus del papiloma o un ADN que codifica un marcador seleccionable.  
15

Este pseudovirión se puede utilizar en un ensayo *in vitro* de "infectividad" en células para evaluar la eficacia de las correspondientes vacunas contra el VLP. Esencialmente, esto se realizará poniendo en contacto las células con dichos pseudoviriones. Estos pseudoviriones se deberán unir a dichas células y permitir la inserción de dicho ADN. Posteriormente, la inserción de dicho ADN se puede evaluar por métodos conocidos, por ejemplo, métodos de hibridación con la PCR, o basarse en la expresión del marcador seleccionable, por ejemplo, la  $\beta$ -galactosidasa.  
20

Esto se realizará tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos generados contra las proteínas L1 o L2 específicas del VPH concreto. Si la inserción se inhibe, como se determina por ejemplo basándose en la expresión reducida del marcador seleccionable, esto es una indicación de que la proteína L1 o la proteína L2 actúan la producción de anticuerpos neutralizantes del virus.  
25

La presente invención es aplicable para producir las VLP de cualquier virus del papiloma y, en particular, cualquier virus del papiloma humano. Se han notificado muchos ADN de L1 y L2 del VPH en la bibliografía, y están a disposición del público (véase, por ejemplo, Baker, Sequence Analysis of Papillomavirus, Genomes, pp. 321-384; Long et al, patente de Estados Unidos n.º 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)). También, es bien sabido que los ADN de la L1 del VPH muestran una homología significativa. De esta forma, un ADN de la L1 del VPH deseado se puede obtener fácilmente, por ejemplo, mediante la utilización de un ADN de la L1 del VPH o fragmento del mismo anteriormente notificado como sonda de hibridación o como cebador durante la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De hecho, se han clonado y expresado numerosos ADN de la L1 del VPH.  
30  
35

Preferentemente, el ADN de la L1 del VPH indicado en la presente invención se derivará de un VPH que esté implicado en cáncer o condilomata acuminata, por ejemplo, VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, y VPH-56 que están implicados en el cáncer, y VPH-6, VPH-11, VPH-30, VPH-42, VPH-43, VPH-44, VPH-54, VPH-55 y VPH-70, que están implicados en las verrugas. Sin embargo, las VLP homogéneas sujeto se pueden producir a partir de cualquier ADN de la L1 del VPH deseado.  
40

En general las secuencias seleccionadas de L1 y opcionalmente de L2 del VPH se expresarán en un sistema de célula hospedadora recombinante deseada, y se utilizará para producir las VLP del VPH para su desmontaje.  
45

El hospedador y el vector de expresión seleccionados se cultivarán en condiciones que favorecen la producción de las VLP. Esto dependerá en gran medida del sistema hospedador seleccionado y de las secuencias reguladoras incluidas en el vector, por ejemplo, si la expresión requiere inducción. Tras la expresión, las VLP del VPH se extraerán de las células hospedadoras. El medio de extracción también dependerá, en cierta medida, del sistema hospedador/vector.  
50

Por ejemplo, si se selecciona un vector de expresión intracelular, las células hospedadoras deberán lisarse, y las VLP del VPH deberán recuperarse del lisado. Por el contrario, si el vector de expresión contiene secuencias que facilitan la secreción, las VLP del VPH se pueden recuperar directamente del medio de cultivo. Los métodos para recuperar proteínas homólogas a partir de células hospedadoras recombinantes y medio de cultivo son bien conocidos en la técnica.  
55

Las secuencias de L1 del VPH se pueden expresar en cualquier célula hospedadora que proporcione la expresión de rendimientos recuperables de las VLP del VPH. Los sistemas hospedadores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidos e incluyen, a modo de ejemplo, bacterias, células de mamífero, levaduras, y células de insecto. Un sistema de expresión preferido comprende el sistema de baculovirus/célula de insecto utilizado en los ejemplos, ya que este sistema proporciona altos rendimientos de proteína. Sin embargo, las proteínas L1 y L2 del VPH se pueden producir en otros sistemas, en particular bacterias y levaduras.  
60  
65 Los vectores adecuados para clonar la expresión de las secuencias de ADN que codifican la L1 del VPH sujeto son

bien conocidos en la técnica, y están comercialmente disponibles. Además, también son bien conocidas las secuencias reguladoras para conseguir la clonación y la expresión, por ejemplo, promotores, secuencias de poliadenilación, potenciadores y marcadores seleccionables. La selección de las secuencias adecuadas para obtener rendimientos de proteína recuperables es algo rutinario para el experto en la materia.

5 Se ha notificado la aplicación de las VLP en vacunas profilácticas y productos de diagnóstico para el VPH. Los capsómeros producidos por el desmontaje también pueden ser útiles, ya que se ha descubierto que tienen epítomos conformacionales neutralizante, e inducen anticuerpos neutralizantes. Las VLP sujeto pueden ser una ventaja para esto debido a su mayor homogeneidad y potencialmente, estabilidad.

10 Como se ha descrito, la presente invención deberá ser ampliamente aplicable a cualquier secuencia de L1 del VPH. Existe una variedad de tipos de VPH conocidos en la técnica. Además, tipos concretos de VPH están asociados con infecciones concretas tales como, verrugas planas, verrugas cutáneas, epidermodisplasia verruciformis, lesiones y cáncer de cuello de útero. Se han identificado más de 60 tipos distintos del VPH en lesiones clínicas mediante estudios de homología de secuencia de nucleótidos víricos. Véase, por ejemplo, Jenson et al, En: Belshe, R. ed., Textbook of human virology, Second Edition, MASS:PSG, 1989:951 y Kremsdorf et al, J. Virol., 52:1013-1018 (1984). El tipo de VPH determina, en parte, el sitio de la infección, las características patológicas y el aspecto clínico, así como la evolución clínica de la correspondiente lesión.

20 Como se cree que hay poca o ninguna inmunidad cruzada para los tipos del VPH y la inmunidad para la infección es específica del tipo de VPH, será necesario producir las VLP del VPH para cada tipo específico del VPH para el que se requiera protección o tratamiento. Sin embargo, debido a la homología entre las proteínas y los genes de L1, se pueden utilizar técnicas de hibridación para aislar el gen L1 particular de interés. Las sondas de nucleótidos seleccionadas de las regiones de la proteína L1 que se han demostrado que muestran homología de secuencia se pueden utilizar para aislar otros genes L1. Los métodos de hibridación son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Maniatis et al, 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, se pueden utilizar métodos de PCR para amplificar los genes L1 o los fragmentos génicos (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.683.195; 4.683.202; y 4.800.159).

35 Las partículas de virus también se pueden aislar para un tipo particular de virus del papiloma, clonarse el ADN, y aislarse las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas L1. Se han notificado los métodos para aislar partículas víricas y clonar los ADN del virus (véase, por ejemplo, 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).

40 Alternativamente, se puede aislar la proteína L1 de un virus del papiloma humano concreto, determinarse la secuencia de aminoácidos, y construirse las sondas de ácido nucleico basándose en la secuencia de ADN prevista. Dichas sondas se pueden utilizar para aislar el gen L1 a partir de una biblioteca de ADN del virus del papiloma (véanse, por ejemplo, Suggs et al, PNAS, 78(11):6613-6617 (1981) y Young and Davis, PNAS, 80:1194 (1983)).

45 Como se descrito, la formación de las VLP es algo sensible al tipo de célula donde se realiza la expresión. Por tanto, es ventajoso seleccionar sistemas que producen grandes cantidades de VLP como material de partida para el desmontaje de VLP. En general, el sistema de expresión comprenderá un vector que tenga la proteína L1 de interés y las regiones reguladoras adecuadas, así como una célula hospedadora adecuada.

50 Como se ha descrito, se utilizan preferentemente un vector baculovirus. Un sistema baculovirus tiene la ventaja de que un gran porcentaje de las células se puede inducir para expresar la proteína debido al uso de la infección en lugar de técnicas de transfección. Aunque el baculovirus es un virus de insecto y crece en células de insecto (Sf9), estas células conservan muchos de los mecanismos eucariotas para procesar proteínas, incluyendo la glicosilación y la fosforilación, que pueden ser importantes para generar las proteínas con la conformación adecuada. Los sistemas de vector baculovirus son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experimental Bulletin, N.º 1555 (1987); Smith et al, Mol. Cell Biol., 3:2156-2165 (1985); Posse, Virus Research, 5:4359 (1986); y Matsuura, J. Gen. Virol., 68:1233-1250 (1987)). También, se ha notificado que las células infectadas por baculovirus expresan proteínas L1 del VPH que muestran la conformación adecuada.

60 Para su expresión en un sistema de expresión adecuado, un gen L1 o un gen L1 modificado se une operativamente en un vector de expresión y se introduce en una célula hospedadora para permitir la expresión de la proteína L1 por dicha célula. El gen con las regiones reguladoras apropiadas se proporcionará en la orientación y marco de lectura correctos para permitir su expresión. Los métodos para la construcción de genes son conocidos en la materia (véase, en particular, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Sambrook et al, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 65 Segunda edición, Cold Spring Harbor, NY (1989)), y las referencias citadas en el mismo. Se puede emplear una amplia variedad de secuencias de transcripción y de regulación. Las señales se pueden

5 derivar de fuentes víricas, donde las señales reguladoras están asociadas con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Esto es, se utilizan promotores fuertes, por ejemplo, de origen vírico o de mamífero. De esta forma, las condiciones óptimas para llevar a cabo la invención incluyen la clonación del gen L1 en un vector de expresión que exprese un exceso de epítomos neutralizantes del virus dependientes de la conformación de la proteína L1 en células transfectadas o células diana infectadas.

10 La adecuabilidad de las VLP del VPH producidas de acuerdo con la invención como vacunas o como agentes de diagnóstico se confirma por la reacción con anticuerpos o con anticuerpos monoclonales que reaccionan o reconocen epítomos conformacionales presentes en el virión intacto y en función de su capacidad para activar la producción de un antisuero neutralizante. Los expertos en la técnica conocen los ensayos adecuados para determinar si se producen anticuerpos neutralizantes. Esta es una característica esencial de las VLP del VPH que se van a utilizar en las vacunas contra VPH. De esta forma, se puede verificar si las VLP del VPH desencadenarán la producción de anticuerpos neutralizantes contra el VPH. De esta forma, se pueden probar otros vectores de expresión y sistemas de expresión para su uso en la invención.

15 Como se ha descrito, las VLP producidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden utilizar para detectar, diagnosticar, serotipado, y tratar la infección por el virus del papiloma. Cuando se usa para el diagnóstico o el serotipado, las VLP de acuerdo con la invención se pueden etiquetar usando una variedad de etiquetas y métodos de etiquetado. Los ejemplos de etiquetas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero sin limitación, etiquetas enzimáticas, etiquetas radioisotópicas, etiquetas isotópicas no radiactivas, etiquetas fluorescentes, etiquetas de toxinas, y etiquetas quimioluminiscentes.

20 Los ejemplos de etiquetas enzimáticas adecuadas incluyen malato hidrogenasa, nucleasa de estafilococo, delta-5-esteroide isomerasa, levadura-alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, etc.

25 Los ejemplos de etiquetas radioisotópicas adecuadas incluyen  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{To}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{SC}$ , y  $^{109}\text{Pd}$ .

30 Los ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen una etiqueta  $^{152}\text{Eu}$ , una etiqueta de fluoresceína, una etiqueta de isotiocianato, una etiqueta de rodamina, una etiqueta de ficoeritrina, una etiqueta de ficocianina, una etiqueta de alofocianina, una etiqueta de o-ftaldehído, una etiqueta de fluorescamina, etc.

35 Los ejemplos de etiquetas de toxina adecuadas incluyen la toxina diftérica, ricino, y toxina del cólera. Los ejemplos de etiquetas quimioluminiscentes incluyen una etiqueta luminal, una etiqueta isoluminal, una etiqueta de éster de acridinio aromático, una etiqueta de imidazol, una etiqueta de sal de acridinio, una etiqueta de éster de oxalato, una etiqueta de luciferina, una etiqueta de luciferasa, una etiqueta de Aequorina, etc.

40 Los expertos en la técnica conocerán otras etiquetas adecuadas que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. La unión de estas etiquetas a las VLP se puede llevar a cabo usando técnicas convencionales normalmente conocidas del experto en la materia. Las técnicas típicas se describen en 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 se incorporan por referencia al presente documento.

45 La detección de los anticuerpos dirigidos contra el VPH usando las VLP sujeto se puede mejorar mediante el uso de transportadores. Los transportadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del transportador puede ser tanto soluble en determinada extensión o insoluble para los fines de la presente invención. El experto en la materia detectará otros muchos transportadores adecuados para su unión a las proteínas, o podrá dilucidarlos mediante el uso de experimentación rutinaria.

50 En un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona el desarrollo de vacunas VP. Las vacunas de la invención incluirán una cantidad de las VLP del VPH sujeto suficiente para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes en el hospedador incluido en un transportador farmacéuticamente aceptable.

55 La administración de las vacunas que contienen las VLP sujeto de acuerdo con la memoria descriptiva se puede llevar a cabo por cualquier medio farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, por vía parenteral, local o sistémica, incluyendo a modo de ejemplo, la administración oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, y tópica. La forma de administración depende de factores entre los que se incluyen la ruta natural de la infección. La dosis administrada dependerá de factores entre los que se incluyen la edad, estado de salud, peso, tipo de tratamiento concurrente, de existir, y naturaleza y tipo del virus del papiloma humano particular. La vacuna se puede utilizar en una forma farmacéutica tal como cápsulas, soluciones líquidas, suspensiones o elixires, para administración oral, o en formulaciones líquidas estériles tales como soluciones o suspensiones para uso parenteral o intranasal. Se utiliza

preferentemente un transportador inerte inmunológicamente aceptable, tal como suero salino o una solución salina tamponada con fosfato.

5 Las vacunas se administrarán en cantidades terapéuticamente eficaces. Esto es, en cantidades suficientes para producir una respuesta inmunológica protectora. En general, las vacunas se administrarán en dosis comprendidas entre aproximadamente 0,1 mg de proteína hasta aproximadamente 20 mg de proteína, más generalmente de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg de proteína. Se pueden administrar dosis simples o múltiples.

10 El método de la presente invención se puede utilizar en la preparación de las VLP del VPH que contienen vacunas para prevenir la infección el virus del papiloma. Además, siguiendo los métodos de la invención, se pueden fabricar vacunas de cualquier virus del papiloma específico del ser humano.

15 Puesto que más de un tipo de VP puede estar asociado con las infecciones de VP, las vacunas pueden comprender las VLP del VPH estables derivadas de más de un tipo de VP. Por ejemplo, como el VPH 16 y 18 están asociados con carcinomas de cuello de útero, por tanto, una vacuna para la neoplasia de cuello de útero puede comprender las VLP del VPH 16; del VPH 18; o de ambos VPH 16 y 18.

20 De hecho, se sabe que una variedad de neoplasias están asociadas con infecciones de VP. Por ejemplo, los VPH 3a y 10 se han asociado a verrugas planas. Se han notificado numerosos tipos del VPH asociados a la epidermodisplasia verruciformis (EV) incluyendo los VPH 3a, 5, 8, 9, 10, y 12. Se ha notificado que los VPH 1, 2, 4, y 7 están asociados con verrugas cutáneas, y los VPH 6b, 11a, 13, y 16 están asociados con lesiones de las membranas mucosas (véase, por ejemplo, Kremsdorf et al, J. Virol., 52:1013-1018 (1984); Beaudenon et al, Nature, 321:246-249 (1986); Heilman et al, J. Virol., 36:395-407 (1980); y DeVilliers et al, J. Virol., 40:932-935 (1981)). Así, las formulaciones de vacuna sujeto pueden comprender una mezcla de las VLP montadas de nuevo derivadas de diferentes tipos de VPH dependiendo de la protección deseada.

30 Como se indica, las VLP del VPH de la invención también se pueden utilizar para el serotipado y la incorporación a kits de serotipado.

Para los ensayos serológicos, los kits comprenderán las VLP del VPH sujeto, y medios para la detección, tales como sustratos enzimáticos, anticuerpos marcados, y similares.

35 Habiendo descrito la invención de una forma general, los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes, salvo que se especifique de otra forma.

### Ejemplos

40 Se usaron en los Ejemplos los siguientes materiales y métodos.

#### Materiales y métodos

##### VLP del VPH-11

45 Para uso en los estudios del desmontaje de las VLP y del montaje posterior utilizando la proteína pura, las proteínas L1 del VPH-11 se expresaron heterológicamente en células de *Trichoplusia ni* (High Five<sup>®</sup>) infectadas con baculovirus recombinantes que codifican el marco de lectura abierto de las L1 completas en la dirección 3' del promotor de la polihedrina como se ha descrito en (Ghim et al, In M.A. Stanley (ed.) Immunology of human papillomaviruses, Plenum, Nueva York, p. 147-153 (1993)). Se recogieron las células aproximadamente 72 horas después de la infección, se aglomeraron mediante centrifugación, y se congelaron. Para la preparación de las VLP, la pasta celular se volvió a suspender en tampón de homogeneización (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contiene 10 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de aprotinina, and 1 µg /ml de pepstatina A) y se lisó en un microfluidizador (Microfluidics modelo HC8000/3A). A continuación, el lisado homogeneizado se centrifugó a 100.000 x g durante 90 minutos y el aglomerado que contenía las VLP del VPH-11 se volvió a suspender en PBS que contenía CsCl (405 g/l). A continuación, el lisado clarificado se centrifugó durante la noche a 83.000 x g y se recogió la banda de VLP. Las VLP se diluyeron en PBS-NaCl 0,5 M, y se distribuyeron en capas en un gradiente en etapas de dos componentes compuesto por un 30 % y un 63 % de sacarosa. Se centrifugaron los gradientes a 167.000 x g durante 3 horas, y la banda de VLP purificada se recogió en la interfase entre las soluciones del 30 % y el 63 % de sacarosa. A continuación, se dializaron las VLP en los tampones seleccionados (tanto PBS, como 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 mediante el ensayo 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 como se ha descrito (Suzich et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11553-11557 (1995)). Partiendo de 25-30 g de pasta celular húmeda, el protocolo anterior dio como resultado 15-25 mg de las VLP de VPH-11

65

##### VLP de VPH-16<sub>Tr</sub>

Para uso en los estudios del desmontaje de las VLP y el montaje posterior durante la purificación, las proteínas L1 de HPV-16<sub>Tr</sub> (compuestas por una forma mutada de la proteína L1 del VPH-16 de la cual se han eliminado los 34 aminoácidos del extremo C) se expresaron en células High Five<sup>®</sup> como se ha descrito anteriormente. La pasta celular se volvió a suspender en tampón de extracción (Tris 10 mM, Triton X-100 al 1,0 %, pH 6,0), se mezcló mediante agitación, y se centrifugó un tiempo corto a 1.000 x g. El aglomerado que contenía las VLP del VPH-16<sub>Tr</sub> se volvió a suspender en Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, tampón a pH 8,0, se sometió a vortización un tiempo corto, y se centrifugó a 3.000 x g durante 30 min. El sobrenadante se recogió, se filtró a través de filtros de jeringa de 0,45 µ de acetato de celulosa, y a continuación se incubaron en presencia o ausencia de 4 % de βME durante >2 horas a 4°C antes de su uso en ensayos de purificación en columna. Se aplicó el sobrenadante filtrado clarificado (+/-βME) a diferentes resinas de intercambio iónico a valores de conductividad bajos (5-15 miliohms), se lavó con varios volúmenes de columna de tampón de equilibrio y se eluyó con un gradiente creciente de NaCl. Para ensayar la utilidad de HIC para eliminar el ADN residual y los contaminantes de la proteína, las fracciones que contenían el pico de la proteína L1 eluida de IEC se combinaron, se ajustaron a 0,7 M en sulfato de amonio y se aplicaron a una columna HIC equilibrada en el mismo tampón. La columna se lavó con varios volúmenes de columna del tampón de equilibrio, y a continuación se eluyó la proteína L1 a partir de la columna HIC a una concentración menor de sulfato de amonio. Los productos finales de los procesos de purificación (+/-βME) se dializaron extensamente frente a PBS (NaCl 0,5 M) y se compararon en términos de pureza, rendimiento, y ADN residual. La aparición de las VLP se caracterizó mediante el microscopio de electrones y el análisis lineal en gradiente de sacarosa (véase a continuación).

#### Centrifugación en gradiente de sacarosa

Se utilizaron tres tipos de gradientes de sacarosa en estos experimentos. En primer lugar, se usó la centrifugación en cojines de sacarosa al 30 % para identificar condiciones que favorecieran el desmontaje de las VLP en componentes solubles. 100-200 µl de mezclas de reacción que contenían las VLP (50-100 µg de proteína total) más o menos agentes perturbadores potenciales se distribuyeron en capas en la parte superior de tubos de centrifuga de 5 ml con 4,8 ml de sacarosa al 30 % (p/p en PBS-NaCl 0,5 M) y se centrifugaron a 197.000 x g durante 2 horas a 40 °C en un rotor basculante. Se tomó una alícuota de 50 µl de la parte muy superior del tubo, y se mezcló con un tampón de preparación de muestras 2X Laemmli (Laemmli, U.K., Nature, 227:680-685 (1970)). El resto del cojín de sacarosa al 30 % se retiró mediante una pipeta, y el "aglomerado" (normalmente ninguno era visible) se volvió a suspender en 100 µl de tampón de preparación de muestras 1X Laemmli. A continuación, se determinó la presencia de proteína L1 del VPH-11 en la parte superior o la parte inferior del cojín de sacarosa al 30 % mediante SDS/PAGE y se cuantificó la cantidad relativa de L1 mediante el análisis de los geles digitalizados. En segundo lugar, se determinó el estado de las VLP desmontadas mediante centrifugación de tasa zonal a través de gradientes de sacarosa al 5-20 % lineales. Las VLP desmontadas (100-200 µg de proteína total en 400 µl) se distribuyeron en capas en la parte superior de gradientes de 11,6 ml preformados compuestos por sacarosa al 5-20 % (p/v en PBS.NaCl 0,5 M), y se centrifugaron a 111.000 x g durante 24 horas a 4,4 °C en un rotor basculante. Las fracciones (0,5 ml) se recogieron a través del gradiente, y el "aglomerado" (normalmente ninguno era visible) se volvió a suspender en 0,5 ml de PBS mediante homogeneización Dounce. Se determinó la posición de la proteína L1 del VPH-11 a través del gradiente mediante inmunotransferencia. Se calibraron los gradientes utilizando proteínas patrón con coeficientes de sedimentación establecidos (*E. coli* β-galactosidasa, 19 S; catalasa de hígado de bovino, 11,3 S; albúmina de suero de bovino, 4,3 S) y el porcentaje en las fracciones se determinó mediante refractometría.

En tercer lugar, se determinó el estado de las VLP iniciales desmontadas y montadas posteriormente mediante centrifugación de tasa zonal a través de gradientes lineales de sacarosa al 10-65 %. La proteína L1 del VPH-11 (100-200 µg de proteína total en 400 µl) en diferentes estados de montaje se distribuyeron en capas en la parte superior de gradientes de 11,6 ml preformados compuestos por sacarosa al 10-65 % (p/v en PBS.NaCl 0,5 M), y se centrifugaron a 188.000 x g durante 2,5 horas a 40 °C en un rotor basculante. Se recogieron los gradientes (en fracciones de 1,0 ml), se analizaron, y se calibraron como anteriormente, con el parvovirus B19 (70 S) y se usaron las VLP de L1 del VPH-18 (160 S) como patrones de calibración adicionales.

#### Electroforesis en gel

##### 55 SDS/PAGE

Se llevó a cabo la SDS/PAGE en gran medida de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, U.K., Nature, 227: 680-685 (1970)). Las muestras se mezclaron con un tampón de preparación de muestras, se llevaron a ebullición durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente en una minicentrífuga y se cargaron sobre minigeles al 7,5 % (Fig. 1) o al 10 % (Figs. 2-4) con un gel de apilado al 4 %. Los geles se analizaron durante aproximadamente 1 hora a una corriente constante de 20 mA a temperatura ambiente, y se visualizó la proteína mediante tinción con azul brillante de Coomassie R250.

**Inmunotransferencia**

Se prepararon las electrotransferencias de L1 del VPH-11 a partir de geles de SDS/PAGE en gran medida de acuerdo con el método de Towbin et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354 (1979)]. Las transferencias se bloquearon con proteína de leche desnatada al 1 % en PBS durante la noche a 4 °C. Las transferencias se sondearon con AU1 (Berkely Antibody Co.), un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra un epitopo lineal en proteínas L1 del virus del papiloma humano (25) durante 90 minutos, se lavaron con PBS al 0,1 %, Triton X-100 y a continuación se volvieron a bloquear durante 30 minutos. A continuación, se incubaron las transferencias con IgG de cabra dirigida contra IgG de ratón marcada con HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc.) durante 40 minutos y se lavaron como anteriormente. A continuación, se revelaron las transferencias con el reactivo de transferencia Western ECL (Amersham), y se expusieron a una película de rayos X.

**Análisis de geles**

Se determinaron la  $M_r$  de la L1 monomérica y oligomérica a partir de sus valores de  $R_f$  en SDS/PAGE al 7,5 % en comparación con las proteínas normalizadas (Véase, Jackowski et al, In T. E. Creighton (ed.), Protein structure: a practical approach, IRL Press, Nueva York, p 1-21 (1989)) Cuando estaba indicado, los geles se digitalizaron sobre un densitómetro de lecho uniforme Hewlett Packard Scanjet Plus, y se determinó la intensidad de las bandas utilizando el software Scan Analysis (versión 2.2; Specrom Research).

**Microscopio electrónico**

Las muestras de proteínas se dejaron sedimentar sobre rejillas de cobre revestidas con formvar y carbono (Electron Microscopy Sciences), se transfirieron por vía seca, y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2 % filtrado recientemente (pH 6,8). Las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo 1005 a una tensión de aceleración de 100 KV y se fotografiaron a aumentos nominales de 15-25.000x.

**Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA)**

Las VLP de L1 del VPH-11 (0,5-1,0 mg/ml de L1) en PBS-NaCl 0,3 M se almacenaron sin tratamiento a 4 °C, o se incubaron durante la noche a 4 °C tras la adición de  $\beta$ ME (a una concentración final del 5 %) o tampón carbonato 2,0 M, pH 9,6 (a una concentración final de carbonato 200 mM). A continuación, se dializó una porción de las muestras tratadas frente a 4 x IL PBS-NaCl 0,5 M a 4 °C durante  $\geq$  24 h. Todas las muestras se diluyeron a una concentración de 0,8  $\mu$ g de L1/ml y se distribuyeron en los pocillos de placas de microvaloración (80 ng de L1 por pocillo). Las VLP sin tratar y el material dializado se diluyeron en PBS. La muestra tratada con  $\beta$ ME se diluyó sin diálisis posterior en PBS que contenía  $\beta$ ME al 5 %, y una muestra incubada sin dializar en carbonato 200 mM se diluyó en carbonato 200 mM, pH 9,6. Tras la incubación a 37 °C durante 1 h, se lavaron las placas con PBS, Tween-20 al 0,1 % (PBS-Tw) y se bloquearon con proteína de leche desnatada al 5 % en PBS. Anticuerpos monoclonales (AU1, o H11.F1 y H11.A3 purificados de ascites, adquiridos de 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. Tras una incubación de 2 h a temperatura ambiente, se lavaron las placas con PBS-TW y se añadió IgG de cabra contra IgG de ratón marcada con HRP. Después de 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron como anteriormente y se revelaron con sustrato HRP (Kirkegaard and Perry Laboratories). Se realizaron medidas de densidad óptica a 405 nm en el punto final de 15 min. Se calcularon los promedios de los pocillos por duplicado como los valores de densidades ópticas finales.

**Ensayo de neutralización del VPH 11**

Los antisueros contra las VPL del VPH-11 purificado original y las VLP del VPH-11, que se desmontaron mediante exposición prolongada al agente reductor de sulfhidrilo y a continuación se montaron posteriormente tras la eliminación del agente reductor mediante diálisis, se generaron en ratones BALB/c (grupos de 5). Se inyectaron los ratones por vía s.c con 1  $\mu$ g de VLP absorbida en 1 mg/ml de adyuvante de alhidrogel en las semanas 0, 4 y 9 con extracciones de sangre terminales llevadas a cabo en la semana 13. Para determinar si el aumento de antisueros en ratones era capaz de neutralizar el virus VPH-11, se ensayó la capacidad de los antisueros de bloquear la expresión en un ARNm tras corte y empalme de un VPH-11 específico en una línea celular humana (HaCaT).

El Dr. Norbert Fusening proporcionó HaCaT, una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizada (Boukamp et al, J. Cell Biol., 106: 761-771 (1988)). Se hicieron crecer las células hasta confluencia en 154/HKGS (Cascade Biologics, Inc.) suplementado con penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100  $\mu$ g/ml) en placas de 24 pocillos. Virus madre VPH-11 Hershey, adquirido del Dr. John Kreider (Kreider et al, J. Virol., 61:590-593 (1987)), se sonicó durante 25 s en hielo, se diluyó en medio 154/HKGS, y se incubó durante una hora a 37 °C. se aspiró el medio de las células HaCaT y se añadieron 0,5 ml de virus diluido por pocillo. Como un control, 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 VPH-11 en un volumen final de 0,5 ml durante una hora a 37 °C tras la adición a las células HaCaT. Se añadió medio reciente a cada pocillo de células cuatro días

después de la infección y en el día seis se recogieron las células y se preparó el ARN celular total utilizando Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc.). Los aglomerados de ARN finales se volvieron a suspender en 20  $\mu$ l de agua tratada con DEPC y se cuantificaron mediante espectrofotometría.

5 Se determinó la capacidad de los antisueros para bloquear la expresión del ARNm tras corte y empalme específico del VPH-11 mediante la transcriptasa inversa (RT)-PCR. Se llevaron a cabo las reacciones de la RT usando un kit First Strand cDNA (Boehringer Mannheim) con 2  $\mu$ g del ARN total como el molde y un oligonucleótido dT como el cebador. Se necesitaron PCR anidadas para detectar el ADNc del VPH-11 E1 $\Delta$ E4. Se llevó a cabo el primer ciclo de  
10 amplificación con 25 % del ADNc de cada reacción RT y 5'-TACAAGACCTTTTGCTGGGCACA-3" (localizado en las bases 765-787 en la secuencia genómica del VPH-11) con el cebador directo exterior y 5'AAAGGCAGGAAAATAGCACAC-3' (localizado en las bases 4088-4110 en la secuencia genómica del VPH-11) como el cebador inverso exterior durante 30 ciclos de la PCR. Se usó un diez por ciento de la mezcla de la PCR del primer ciclo para las reacciones anidadas con 5'ATATTGTGTGTCCTGCG-3" (localizado en las bases 792-812 como cebador directo anidado y 5'-CAGCAATTTGTACAGGCACTAC-3' (localizado en las bases 3877-3898 en la  
15 secuencia genómica del VPH -11) como el cebador inverso anidado durante 30 ciclos de la PCR. Se configuraron las reacciones de la PCR del primer ciclo y de la PCR anidada con perlas Hot Wax (1,5 mM) y tampón a pH 9,5 (Invitrogen), con 200  $\mu$ M de dNTP, 125 ng de cada cebador directo e inverso, y 2,5 unidades de la polimerasa Taq (Perkin-Elmer) en un volumen final de 50  $\mu$ l. El perfil de temperatura para la PCR del primer ciclo y la PCR anidada era de 80 °C/5 min, 95° C/30 s, 72°C/30 s, con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

20 Como control para demostrar que el ensayo podía detectar el ARNm extraído de las células HaCaT, se usaron todas las muestras de ADNc en reacciones de la PCR separadas con cebadores específicos para el corte y empalme de la  $\beta$ -acción celular del ARNm como se ha descrito y se amplificaron como anteriormente (Smith et al, J. Invest. Dermatol., 105: 1-7 (1995)).

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

### 30 Ejemplo 1

#### *Desmontaje cuantitativo de las VLP del VPH-11*

Se prepararon cantidades relativamente grandes de las VLP de L1 del VPH-11 como material de partida para el estudio del desmontaje y montaje posterior de la VLP. Se aislaron las VLP de L1 del VPH-11 a partir de células High Five<sup>®</sup> infectadas con baculovirus recombinante mediante centrifugación en gradiente de CsCl y sacarosa. La pureza  
35 calculada de estas preparaciones de L1, basada en el análisis densitométrico de SDS/PAGE, varió entre un 70-90 % (véase la Fig. 1, banda 2). Además, en los gradientes lineales de sacarosa, la mayoría de la proteína migró como se esperaba para una mezcla de VLP individuales y agrupadas (Fig. 4a), y se observó en el microscopio electrónico una mezcla de partículas de tamaño intermedio y de tamaño completo (50-55 nm) (Fig. 5a).

40 Las interacciones covalentes y no covalentes que estabilizan las VLP de L1 montadas no se conocen completamente, pero un trabajo anterior sobre las VLP del virus del papiloma humano y los viriones del virus del poliovirus relacionados y las VLP sugiere la importancia de la fuerza iónica, cationes divalentes (Brady et al, J. Virol., 23:717-724 (1977); Salunke et al, Biophys. J., 56:887-900 (1987), y enlaces disulfuro (Sapp et al, J. Gen. Virol., 76:2407-2512 (1995); Volpers et al, Virology, 200:504-512 (1994)). En particular, Sapp y colaboradores habían demostrado mediante inmunotransferencia que el 50 por ciento de la proteína L1 de las VLP de VPH-33 se unía mediante enlaces disulfuro en un intervalo de oligómeros más grandes con una  $M_r$  aparente, consistente con los trímeros de L1, y que las condiciones de reducción suaves descomponen las VLP del VPH-33 al nivel hasta los capsómeros (Sapp et al, J. Gen. Virol., 76:2407-2412 (1995); Volpers et al, Virol., 200:504-512 (1994)). En los  
45 estudios de los inventores, en ausencia de agentes reductores, solo una parte de la proteína L1 del VPH-11 migró en la SDS/PAGE con una  $M_r$  evidente de 55.000 Da (Fig. 1, Banda 1). Aproximadamente el 40 % (el porcentaje varió entre diferentes preparaciones de VLP) de la proteína L1 de VPH-11, las VLP estaba unida mediante enlaces disulfuro en oligómeros más grandes (Fig. 1, Banda 1), con valores de  $M_r$  previstos de aproximadamente 144.000 Da (posiblemente, el trímero de L1) y 210.000 Da (posiblemente, el tetrámero de L1). Los oligómeros de L1 no migran como una única banda, y parecía que eran heterogéneos en tamaño. Sapp y colaboradores observaron también el oligómero de 200.000 Da en inmunotransferencias (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 mayor peso molecular. Estos resultados indican que una parte de las VLP de las proteínas L1 del VPH-11 están unidas mediante enlaces disulfuro en oligómeros mayores. Para estudiar el papel de los enlaces disulfuro y otras interacciones en la estabilidad de la VLP, se desarrolló un ensayo de cribado rápido para el desmontaje de la VLP. Las VLP de L1 del VPH-11 purificadas, antes y después de varios tratamientos, se distribuyeron en capas en la parte superior de los cojines de sacarosa al 30 %, se centrifugaron, y la distribución de la proteína L1 en la parte superior y en la parte inferior del cojín de sacarosa al 30 % se visualizó mediante SDS/PAGE. Se esperaba que las VLP intactas se agruparan a través del cojín de sacarosa al 30 %; se esperaba que los capsómeros no agregados y el monómero de L1 permanecieran en la parte superior del cojín. En la Fig. 2 se muestra un ejemplo de este ensayo. Para cuantificar la disposición relativa de la proteína L1, se digitalizaron los geles, se determinó la intensidad total de las bandas L1 en la parte superior y en la

parte inferior del cojín, y a continuación se calculó el porcentaje de intensidad de la tinción de L1 en cualquier posición. Los resultados de varias de las mencionadas determinaciones se tabularon en las Tablas 1 y 2. Como se ha demostrado en la Fig. 2, el material de partida de VLP purificada sedimentó a través de la sacarosa al 30 %, como se había previsto, sin que fuera evidente la L1 en la parte superior. Sin embargo, tras la incubación con una elevada concentración del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME), la proteína L1 se encontraba en gran medida en la parte superior del cojín de sacarosa al 30 %, indicando que el agente reductor había desmontado las VLP del VPH-11 en componente más pequeños, no agregados. De forma interesante, el desmontaje máximo de las VLP requirió normalmente la exposición a una concentración muy alta de agente reductor (en este caso un 5 % o  $\beta$ ME 713 mM) durante un periodo relativamente largo (-16 horas a 4 °C). Concentraciones menores del agente reductor o duraciones más cortas de reducción no eran tan fiables y eficaces en el desmontaje de la VLP. La adición de una concentración baja de un agente quelante no potencia el desmontaje (Fig. 2 y Tabla 1).

Además de los reductores, se ha descubierto que las 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 la VLP. Como se observó anteriormente para los viriones del virus del polio, las condiciones de menor fuerza iónica desestabilizan las VLP (Brady et al, J. Virol., 23:717-724 (1977)), aunque Sapp et al (J. Gen. Virol., 76:2407-2412 (1996)) notificaron que la generación de capsómeros de VPH-33 a partir de las VLP era insensible a la concentración salina entre NaCl 0,15 M y NaCl 0,6 M. Para las VLP del VPH-11, el máximo desmontaje (-90 %) de las VLP expuestas a  $\beta$ ME al 5 % durante 16 horas se observó a fuerza iónica "fisiológica" (es decir, NaCl 0,15 M) pero se volvió correspondientemente menos eficaz a medida que la fuerza iónica aumentaba (Tabla 1). El efecto estabilizante de la fuerza iónica aumentada se podría superar parcialmente incubando las VLP con agentes reductores en plazos más largos o a temperaturas elevadas. Sin embargo, aunque la incubación de las VLP con  $\beta$ ME al 5 % durante 120 horas a 4 °C, o durante 24 horas a 24 °C aumentó la extensión del desmontaje en un 60-70 % a NaCl 0,5 M, el desmontaje distaba de estar completo (no se muestran los datos). Además, para el desmontaje cuantitativo, el grado de agregación del material de partida de VLP era también importante. En los experimentos notificados aquí, las soluciones de VLP se dializaron en tampones de fuerza iónica diferentes y se almacenaron a 4 °C hasta el uso en ensayos de desmontaje. Tras varios días, particularmente a NaCl 0,15 M, las soluciones se volvieron ligeramente turbias, indicando algún grado de agregación (aunque se observó poca o ninguna precipitación). El tratamiento de las soluciones de VLP turbias con agentes reductores no da como resultado el mismo grado de desmontaje que el observado con la solución de VLP soluble inicial, indicando que las VLP agregadas eran resistentes al desmontaje. Sin embargo, tras la eliminación del material agregado (que varió entre 10-50 % de las VLP totales dependiendo de la edad de la preparación) mediante filtración, las VLP solubles restantes se pudieron desmontar de nuevo en la misma extensión que el material de partida de la VLP soluble inicial.

De forma interesante, incluso a elevadas concentraciones de quelantes, la quelación de cationes no afecta significativamente el desmontaje de VLP. La diálisis de las VLP en EDTA 200 o tampones EGTA (PBS-NaCl 0,3 M, pH 7,4) conduce a un desmontaje no evidente, y la adición de ditiotreitól 10 mM (DTT) a los tampones de diálisis tuvo poco efecto (Tabla 2). Se confirmó la incapacidad de altas concentraciones de quelantes de desmontar las VLP mediante el análisis con microscopio electrónico, aunque EDTA (pero no EGTA) pareció que hinchaba las VLP ligeramente (no se muestran los datos). Cualquiera de estas concentraciones de quelantes son insuficientes para extraer iones estructuralmente importantes fuertemente unidos, o cationes que no son esenciales para mantener la integridad estructural de la VLP. De forma inversa, la adición de una alícuota concentrada de tampón  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9,6) a una solución de las VLP, hasta una concentración final de carbonato 200 mM (en PBS-NaCl 0,3 M), produjo una rotura significativa de las VLP (Tabla 2). La adición de DTT (hasta una concentración final de 10 mM), no potencia adicionalmente la rotura inducida por carbonato. La incubación de las VLP con carbonato 200 mM/ DTT 10 mM se usa comúnmente para desnaturalizar los viriones de VPH o las VLP en 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 del VPH-11 con tampón glicina a pH 9,6 (concentración final 200 mM) produjo muy poca rotura de la VLP, como se midió mediante el ensayo del cojín de sacarosa al 30 % (Tabla 2). De forma similar, Brady et al (J. Virol., 23:717-724 (1977)), observaron que el tampón carbonato a pH alcalino, pero no solo a pH alcalino, disoció los viriones del virus del polio. Sin embargo, el efecto específico del carbonato a pH 9,6 no parece ser debido a la capacidad quelante potencial del carbonato, como sugirieron Brady et al (J. Virol., 23:717-724 (1977)), debido a que EDTA 200 mM a pH 9,6 (+/- DTT 10 mM) era completamente ineficaz en el desmontaje de la VLP (no se muestran los datos).

## Ejemplo 2

### *Caracterización de las VLP del VPH-11 desmontadas*

Tras la exposición a largo plazo a altas concentraciones del agente reductor, las VLP purificadas parecen romperse hasta los capsómeros. Como se muestra en la Fig. 3a, las VLP desmontadas generadas mediante incubación con  $\beta$ ME al 5 % durante 16 horas a 4 °C migraron en gradientes lineales de sacarosa al 5-20 % con un coeficiente de sedimentación promedio de  $11,3 \pm 1,5 \text{ S}$  ( $n = 5$ ) determinado con respecto a los patrones de sedimentación. Se observaron ocasionalmente especies más grandes, con un coeficiente de sedimentación calculado de 16-18 S (quizá los capsómeros diméricos), e incluso materiales aglomerados. Sin embargo, se detectó menos de un 10 % de

L1 en la parte superior del gradiente (posición esperada para el monómero de L1) o en el aglomerado (posición esperada para las VLP intactas o los capsómeros agregados), sugiriendo que el material de partida de la VLP purificada se desmontó en gran medida hasta los capsómeros individuales tras la reducción prolongada. Esta conclusión está respaldada por el análisis con microscopio electrónico de las VLP tras la incubación prolongada con  $\beta$ ME al 5 %, que representa gráficamente un campo de capsómeros homogéneos (Fig. 5b) con un diámetro promedio de  $9,7 \pm 1,2$  nm ( $n = 15$ ), ocasionalmente con unas pocas estructuras más grandes agregadas aparentes (la L1 monomérica no se detectaría con esta técnica). El diámetro estimado del capsómero es ligeramente más pequeño que el observado mediante crioelectromicroscopía (11-12 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)), debido quizá al acortamiento durante la preparación de la rejilla del 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 purificadas para una población homogénea de capsómeros.

Los capsómeros generados a partir de las VLP del VPH-11 tras la exposición a largo plazo a altas concentraciones de agente reductor contienen epítomos estructurales que se encuentran en las VLP intactas. Se ha descrito un panel de anticuerpos monoclonales específicos del VPH-11 que reaccionan con las VLP de L1 del VPH-11 pero no con la L1 "desnaturalizada". Estos anticuerpos monoclonales incluyen H11.F1, que se ha demostrado que reconocen un epítomo neutralizante dominante en viriones del VPH-11, y H11.A3, un anticuerpo distinto dependiente de estructura no neutralizante (Christensen and Kreider, *J. Virol.*, 64:3151-3156 (1990); Christensen et al, *J. Virol.*, 64:5678-5681 (1990)). Como se ha anticipado, H11.F1 y H11.A3 reaccionaron intensamente con el material de partida de la VLP del VPH-11 purificado cuando se analizó mediante ELISA (Fig. 6a). Sin embargo, estos anticuerpos reaccionaron también con los capsómeros generados a partir del material de partida de la VLP mediante exposición al agente reductor (Fig. 6b). De esta manera, los capsómeros poseen al menos algunos epítomos dependientes de la estructura que se encuentran sobre la superficie de las VLP intactas y viriones auténticos, de acuerdo con los estudios llevados a cabo por Li et al, (*J. Virol.*, 71:2988-2995 (1997)) sobre capsómeros de VPH-11 expresados en *E. coli*. Estos resultados demuestran además que los anticuerpos monoclonales H11.F1 y H11.A3, aunque requieren una conformación "similar a la natural" para la unión, no son dependiente de VLP como se ha descrito previamente (Ludmerer et al, *J. Virol.*, 71:3834-3839 (1997)).

En contraste, los anticuerpos monoclonales H11.F1 y H11.A3 no reconocen las VLP de VPH-11 disociadas por tratamiento con tampón carbonato a pH 9,6 (no se muestran los datos; Christensen et al, *J. Gen. Virol.*, 75:2271-2275 (1994)). El tratamiento con carbonato no conduce a una solución homogénea de capsómeros, que a su vez aparecía como una mezcla indistinta de objetos pequeños, parcialmente agregados, cuando se examinó mediante el microscopio electrónico (no se muestran los datos). Esta visión se confirmó parcialmente mediante el análisis de las VLP tratadas con carbonato en gradientes lineales de sacarosa al 5-20 %, donde la proteína L1 migró en gran medida a -4S, aunque se observó una pequeña población a 9-11 S (Fig. 3B) de acuerdo con los efectos del tampón carbonato (a pH 10,6 con DTT 10 mM) sobre viriones del VPB (Favre et al, *J. Virol.*, 15:1239-1247 (1975)). Finalmente, aunque el tratamiento con tampón glicina a pH 9,6 no disocia las VLP en partículas individuales más pequeñas (Tabla 2), tiene algún efecto. Las VLP tratadas con glicina a pH 9,6 aparecieron en el microscopio electrónico como una mezcla mal definida de VLP intactas, y parcialmente rotas y agregadas (no se muestran los datos).

### Ejemplo 3

#### Montaje posterior cuantitativo de las VLP del VPH-11

El montaje posterior de la VLP de los capsómeros del VPH-11 se produjo tras la eliminación del agente reductor tanto mediante diálisis como mediante cromatografía en columna. Partiendo de una preparación homogénea de capsómeros solubles, la diálisis prolongada en ausencia de agentes reductores dio como resultado una población definida de VLP montadas posteriormente (Figs. 4c y 5c, d). Las VLP montadas posteriormente retuvieron los epítomos estructurales reconocidos por los anticuerpos monoclonales H11.F1 y H11.A3 (Fig. 6c).

Para el montaje posterior, los capsómeros (1-5 ml a 0,5-1,0 mg/ml de proteína total) se dializaron frente a 4 x 1 l de PBS- NaCl 0,5 M a 4°C durante 24 h; la concentración salina elevada se diseñó para estabilizar las VLP. Aunque la adición de agentes quelantes no potencia apreciablemente la capacidad de los agentes reductores para desmontar las VLP (Tabla 1), la presencia de EDTA 2 mM interfirió moderadamente sobre el montaje posterior, dando como resultado VLP que migraron en un gradiente lineal de sacarosa del 10-65 % como una población bastante discreta de partículas 150 S pero que pareció uniformizarse y extenderse al microscopio electrónico (no se muestran los datos). Por el contrario, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM durante la reacción de montaje posterior dio lugar a que las VLP se adhirieran entre sí, como se muestra por el análisis del gradiente lineal de sacarosa al 10-65 %, donde las VLP se montaron posteriormente en presencia de calcio migrado completamente en el aglomerado. Sin embargo, la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no pareció afectar de otra manera la morfología básica de la VLP cuando se examinó al microscopio electrónico (no se muestran los datos). Finalmente, la diálisis de las VLP tratadas con carbonato en PBS NaCl 0,5 M no conduce al montaje posterior de las VLP. En vez de esto, la proteína L1 permaneció tanto como componentes pequeños solubles o amorfos, precipitados agregados, como se evidenció tanto por el microscopio de electrones como el análisis del gradiente lineal de sacarosa al 10-65 % (no se muestran los datos). La diálisis de las

VLP tratadas con carbonato no consiguió restaurar la reactividad con los anticuerpos monoclonales específicos de estructura H11.F1 y H11.A3 (Fig. 6d). *Caracterización de las VLP del VPH-11 montadas posteriormente.*

Tras la eliminación del agente reductor, los capsómeros se volvieron a montar cuantitativamente posteriormente en VLP. De forma sorprendente, las VLP remontadas son mucho más homogéneas respecto al tamaño de partícula que el material de partida de la VLP purificado en con cesio y gradiente de sacarosa. Cuando se compararon las tres etapas de la reacción de desmontaje/montaje posterior mediante gradientes lineales de sacarosa al 10-65 %, el material de partida de VLP purificado se distribuyó a través del gradiente, con muchas partículas migrando a la posición esperada para las VLP intactas (150-160 S), pero con la mayoría de la proteína más abajo del gradiente en el aglomerado (Fig. 4a). De forma similar, cuando se examinó al microscopio electrónico (Fig. 5a), se observó que el material de partida de VLP era una mezcla de partículas de diferente tamaño, incluyendo VLP de tamaño completo, de 50-55 nm de diámetro. Es posible que se produzca alguna perturbación de las VLP durante la extracción y la purificación, dado que el análisis del gradiente lineal de sacarosa de las etapas iniciales del proceso de purificación indicó una distribución más homogénea de los tamaños de partículas (no se muestran los datos).

Tras la exposición a largo plazo a altas concentraciones de los agentes reductores, las VLP se desmontaron en capsómeros, como se ha descrito anteriormente. En comparación con el material de partida de la VLP, los capsómeros migraron a la parte superior de los gradientes lineales de sacarosa al 10-65 % (con poco o ningún L1 detectado en el aglomerado; Fig. 4b), y en el microscopio electrónico aparecieron como un campo de capsómeros sin romper (Fig. 5b).

El remontaje de los capsómeros dio como resultado una población homogénea de VLP de tamaño completo esféricas. Las VLP montadas posteriormente se distribuyeron en bandas en la parte intermedia de los gradientes lineales de sacarosa al 10-65 %, con un coeficiente de sedimentación previsto de  $150,4 \pm 4,6$  S ( $n = 7$ ), con mucha menos L1 detectada tanto en el aglomerado como en la parte inferior del gradiente que la observada con el material de partida de la VLP purificada (Fig. 4c). La homogeneidad de las VLP remontadas fue incluso más sorprendente cuando se examinó al microscopio electrónico, como se ha demostrado en la Fig. 5c, d. Predominantemente, se detectaron partículas en el intervalo de las VLP de tamaño completo, promediando  $56,5 \pm 7,0$  nm ( $n = 15$ ), con muy pocas VLP parcialmente montadas o complejos más pequeños aparentes. Los rendimientos del proceso de remontaje fueron también muy elevados (promediando 83 % en términos de proteína L1 total procedente del material de partida para las VLP montadas posteriormente en condiciones óptimas de desmontaje), debido esencialmente a que todos los capsómeros parecieron a formar las VLP solubles, filtrables, de tamaño completo.

#### Ejemplo 4

*Comparación de la capacidad de las VLP de VPH-11 purificadas iniciales y de las VLP de VPH-11 remontadas para generar anticuerpos neutralizantes de virus*

para que las VLP montadas posteriormente funcionen satisfactoriamente como candidatos de vacunas, es esencial que retengan la capacidad de estimular anticuerpos neutralizantes de virus cuando se inyectan en animales experimentales. Para ensayar esto, se generaron antisueros policlonales tanto de las VLP de VPH-11 purificadas iniciales, como de las VLP de VPH-11 desmontadas/montadas posteriormente en ratones BALB/c como se describe en la sección de Métodos. Cada uno de los antisueros fue igualmente reactivo frente al inmunógeno correspondiente cuando se evaluó en un formato ELISA (no se muestran los datos). De forma más importante, cuando se sometieron al ensayo de neutralización de la RT-PCR que implicaba viriones de VPH-11 infecciosos (Smith et al, J. Invest. Dermatol., 105:1-7 (1995)), los antisueros policlonales específicos de las VLP del VPH-11 remontadas tras la reacción inmunitaria presentaron un título de neutralización de  $10^5 - 10^6$ , igual al obtenido con los antisueros generados contra las VLP del VPH-11 iniciales purificadas (Fig. 7). Esto demuestra que las VLP del VPH11 remontadas retienen el dominio antigénico inmunógeno neutralizante de la cápsida de los viriones del VPH-11, y tienen el potencial de servir como vacunas para la prevención de la enfermedad del VPH genital. Además, dado que las VLP remontadas representan una preparación homogénea de las VLP de tamaño completo (es decir, el tamaño del virus infeccioso), es posible que las VLP remontadas sean inmunógenos más potentes que las VLP purificadas iniciales, que son heterogéneas en tamaño, una posibilidad que se está sometiendo a ensayo actualmente mediante la dosificación de ratones con cantidades decrecientes de VLP iniciales y montadas posteriormente.

#### Ejemplo 5

*Aplicación del desmontaje y montaje posterior de la VLP durante la purificación de las VLP del VPH*

Como se ha descrito anteriormente, los métodos de purificación de proteínas convencionales no están optimizados para utilizar con complejos de proteínas el tamaño de las VLP (partículas de 20.000.000 Da, de 55 nm de diámetro). En particular, el tamaño absoluto de las VLP disminuye drásticamente la capacidad y la utilidad de la mayoría de resinas cromatográficas, ya que la química reactiva en la resina es estéricamente inaccesible a la VLP. Sin embargo, esta dificultad puede potencialmente evitarse desmontando las VLP brutas extraídas de las células, purificando las VLP desmontadas utilizando métodos normalizados, y montando posteriormente las VLP en la etapa deseada de pureza. Un segundo riesgo de la purificación de la VLP es la contaminación con ADN residual. En un trabajo anterior

llevado a cabo con las VLP del VPH-11 purificadas, persiste un determinado nivel de ADN de fondo que no se elimina mediante el tratamiento con ADNasa, sugiriendo que el ADN está tanto encapsulado en las VLP como muy íntimamente asociado con ellas. El desmontaje de las VLP permitiría una mayor eliminación del ADN contaminante, una importante consideración para cualquier compuesto biológico previsto para uso clínico.

5 Para ensayar este potencial, se extrajeron las VLP del VPH-16<sub>Tr</sub> a partir de células de insecto infectadas con baculovirus, y purificadas mediante cromatografía IEC e HIC convencional como se describe en la sección de Métodos, tanto en ausencia del agente reductor sulfhidrilo (VLP intactas), como en presencia de βME al 4 % (VLP desmontadas). En el último caso, las VLP extraídas se incubaron con βME al 4 % durante >2 h a 4 °C antes de la  
10 cromatografía en columnas IEC e HIC, que se equilibraron también en βME. Los productos purificados finales de ambos procedimientos de purificación (es decir, en presencia o ausencia del agente reductor sulfhidrilo) se dializaron frente a 4x1 l de PBS (NaCl 0,5 M), y se determinaron la pureza, el rendimiento y los niveles del ADN residual. Como se muestra en la Tabla 3, una preparación representativa purificada en ausencia de βME dio como resultado las VLP  
15 del VPH16<sub>Tr</sub> que tuvieron una pureza solo de aproximadamente un 60 % (en términos de contaminación de proteínas) y contenían niveles de ADN mayores que los deseados para el uso humano. Por el contrario, tres preparaciones de VLP purificadas en el estado desmontado se caracterizaron por rendimientos mayores, una pureza de proteínas significativamente más elevada y unos niveles de ADN residual sustancialmente reducidos. La mayor pureza de la proteína de las VLP purificadas en el estado desmontado es fácilmente evidente cuando se analiza mediante SDS/PAGE como se muestra en la Fig. 8. El tamaño y la homogeneidad de las VLP del VPH-16<sub>Tr</sub>  
20 montadas posteriormente tras la purificación fueron más heterogéneas que los observados para el remontaje de las VLP del VPH-11 purificadas, pero en promedio, fueron tan homogéneas como las VLP del VPH-16<sub>Tr</sub> purificadas sin desmontaje y en algunos casos formaron VLP de tamaño completo uniformemente homogéneas, algo que los inventores no han observado nunca con las VLP del VPH-16<sub>Tr</sub> purificadas sin desmontaje (no se muestran los datos).

25 Existen interesantes diferencias en los efectos del tratamiento prolongado con agentes reductores de sulfhidrilo entre VPH 16<sub>Tr</sub> y las VLP del VPH-11. En primer lugar, las VLP del VPH-16<sub>Tr</sub> parecen desmontarse cuantitativamente a niveles menores del agente reductor y/o a duraciones más cortas de la exposición (no se muestran los datos). No es evidente que esto refleje una diferencia genuina entre las VLP de VPH-16 y VPH-11, o que esto se deba al truncamiento del extremo C de la proteína L1 de VPH-16<sub>Tr</sub>, ya que, en ensayos preliminares, los autores observaron  
30 que la rotura proteolítica del extremo C de la proteína L1 del VPH-11 también acelera la descomposición de las VLP en presencia del agente reductor de sulfhidrilo. Un rasgo más interesante es que el tratamiento de VLP del VPH-16<sub>Tr</sub> purificadas con el agente reductor de sulfhidrilo parece generar una mezcla de capsómeros, oligómeros más pequeños de la proteína L1 y monómero de L1, sobre la base del análisis con gradiente lineal de sacarosa al 5-20 % sobre las VLP desmontadas del VPH-16<sub>Tr</sub> (Fig. 9). Sin embargo, tras la eliminación del agente reductor mediante  
35 diálisis, esta mezcla de componentes solubles pequeños pudo volver a montarse para dar VLP intactas con un rendimiento de -90 %, como se demuestra mediante el análisis con gradiente lineal de sacarosa al 10-65 % (Fig. 10), y se confirmó por análisis al microscopio electrónico (no se muestran los datos). Estos resultados demuestran que las VLP se pueden desmontar hasta el nivel de los capsómeros, o incluso de oligómeros de L1 más pequeños, y seguir siendo adecuados para volver a montarse para obtener VLP intactas de tamaño completo, siempre que las  
40 condiciones de desmontaje produzcan proteínas L1 correctamente plegadas y solubles.

TABLA 1

Desmontaje de las VLP de la L1 del VPH-11; Efectos de los agentes reductores <sup>a</sup>						
Condición de desmontaje	0,15 M NaCl		0,3 M NaCl		0,5 M NaCl	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
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
5 % pME, 16 h	87,7±3,2	12,4±3,1	70,9±12	29,1±12	53,2±6,8	46,8±6,8
5 βME, 1 h	68,1±11	31,9±11	68,0±10	32±10	-	-
2 % pME, 16 h	72,1 ± 2,7	27,9±2,7	67,6±21	32,3 ± 6,12	-	-
0,5 % pME, 16 h	45,8±18	54,2±16	28,8±16	71,2±16	-	-
DIT 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	-	-	-	-

<sup>a</sup>Las VLP (0,5-1,0 mg/ml de proteína) se trataron como se ha indicado a 4°C, y la distribución de L1 a través de un cojín de sacarosa al 30 % se determinó como se ha descrito en la sección de Métodos. Se muestran los promedios de múltiples determinaciones (n=3-7) ± la desviación estándar.

45

TABLA 2

Desmontaje de las VLP de la L1 del VPH-11; Efectos de quelantes y tampones <sup>a</sup>		
Condición de desmontaje	Superior	Inferior
EDTA 200 mM, pH 7,4	4±3	96±3
EDTA 200 mM, DTT 10 mM	10±6	90±6

Desmontaje de las VLP de la L1 del VPH-11; Efectos de quelantes y tampones <sup>a</sup>		
EGTA 200 mM, pH 7,4	13±11	87±11
EGTA 200 mM, DTT 10 mM	11±6	89±6
NaHCO <sub>3</sub> 200 mM, pH 9,6	81±2	19±2
NaHCO <sub>3</sub> 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

<sup>a</sup>Las VLP (0,5-1,0 mg/ml de proteína) se trataron como se ha indicado durante 16 horas a 4°C, y la distribución de L1 a través de un cojín de sacarosa al 30 % se determinó como se ha descrito en la sección de Métodos. Se muestran los promedios de determinaciones por duplicado ± el intervalo.

TABLA 3

Comparación de la purificación de las VLP de VPH-16 desmontadas e intactas				
Ensayo	Escala	Pureza	Rendimiento	ADN
-βME	24 g	59 %	5,0 %	30 ng/100 µg de L1
+ βME, Ciclo 1	10 g	85 %	10,8 %	5,3 ng/100 µl de L1
+ βME, Ciclo 2	10 g	85 %	18,4 %	0,6 ng/100 µl de L1
+ βME, Ciclo 3	30 g	81 %	6,1 %	--

<sup>a</sup>Una purificación de las VLP intactas (-βME) y tres purificaciones de las VLP desmontadas (+βME, Ciclos 1-3) se compararon entre sí, y se prepararon tal como se ha descrito en la sección de Métodos. La escala indica los gramos de pasta de células utilizados, la pureza se determinó mediante análisis densitométrico de SDS/PAGE del producto final, comparado con la cantidad presente en la pasta de células inicial, y el ADN se determinó según el método del umbral y se notificó por 100 µg de proteína L1, la dosis máxima esperada en seres humanos.

## Conclusiones

5

De esta forma, la presente invención proporciona condiciones precisas para el desmontaje cuantitativo, y el posterior montaje de las VLP del virus del papiloma *in vitro*. Como se ha descrito, los intentos anteriores para desmontar las VLP del papiloma estaban afectados, en cierta medida, por el trabajo realizado sobre el virus del papiloma, un papovirus relacionado, donde se mostró que tanto la reducción de disulfuros como la quelación del calcio eran esenciales para el desmontaje del virion (Brady et al, J. Virol., (1977)). Sin embargo, se ha descubierto sorprendentemente que los bajos niveles de agente reductor (DTT 1-10 mM) proporcionan el desmontaje óptimo del virus del poliovirus en presencia de bajos niveles de agentes quelantes (por ejemplo, EDTA 0,5-10 mM) solo fueron ligeramente eficaces para el desmontaje de las VLP del papiloma (Tabla 1, Li et al, (Id.) (1997)), aunque las VLP de la L1 del VPH-11 parcialmente tripsinizado se disociaron en las condiciones anteriores (Li et al, (Id.) 1997)). Sin embargo, Sapp y colaboradores demostraron que se podían generar capsómeros a partir de las VLP de VPH-33 por tratamiento con agente reductor solamente (DTT 20 mM), aunque no se determinó la extensión de la descomposición de las VLP (Sapp et al, (Id.) 1995)). En los experimentos anteriormente descritos, se descubrió que, cuando se examinaba el desmontaje mediante análisis en gradiente, era necesario analizar la presencia de proteína L1 en el "aglomerado". En muchos casos, el examen de las fracciones a través del gradiente sugería que se había conseguido una buena descomposición. Sin embargo, el examen del aglomerado, incluso cuando no era visible, indicaría que un importante porcentaje de las proteínas seguía en la forma de VLP de tamaño variable, o agregadas de otra manera, tal como se confirma mediante análisis con el microscopio óptico. El desarrollo del ensayo consiguió desmontar las VLP de forma consistente en componentes solubles más pequeños. Se descubrió que el desmontaje cuantitativo hasta una solución homogénea de capsómeros individuales (para las VLP de VPH-11) o una mezcla de capsómeros y oligómeros de L1 correctamente plegados más pequeños y de monómeros de L1 (VLP de VPH-16Tr) pudo lograrse consistentemente mediante un tratamiento prolongado de las VLP no agregadas con altos niveles de agente reductor con tampones de fuerza iónica de moderados a bajos.

10

15

20

25

30

35

40

Como se ha descrito, la observación de que la quelación de cationes no afectaba prácticamente al desmontaje de las VLP del VPH-11 VLP fue sorprendente, ya que se oponía a estudios anteriores con el virus del poliovirus que indicaban que la quelación del calcio activaba el desmontaje del virión, y que la adición de calcio superaría el efecto de los quelantes (Brady et al, (Id.) (1977)). Análogamente, Montross et al, (Id.) (1991), observaron que las VLP del virus del poliovirus, que normalmente se reúnen solamente en el núcleo, se podían formar en el citoplasma tras la adición de un ionóforo de calcio, que supuestamente aumentaba la concentración de calcio citoplasmático hasta el nivel necesario. Sin embargo, el calcio aparentemente no es importante para la estabilidad de cápsidas de L1 de VPH-11. A la inversa, el tratamiento con tampón carbonato a pH alcalino produjo el "desmontaje" de las VLP de la L1 del VPH-11 de forma similar a los resultados observados con viriones del virus del poliovirus (Brady et al, (Id.) 1977)). Sin embargo, este tratamiento parece más intenso, ya que las VLP no se pudieron regenerar mediante diálisis en PBS-0,5 M NaCl seguido por tratamiento con carbonato.

El desmontaje de las VLP del VPH-11 mediante el tratamiento con carbonato dio como resultado que la proteína L1 no pudiera reaccionar con los anticuerpos monoclonales específicos de VPH-11 dependientes de la estructura. Por

el contrario, el desmontaje de las VLP de L1 del VPH-11 mediante la reducción prolongada dio como resultado capsómeros que tenían epítomos específicos de estructura que aparecen sobre la superficie de las VLP de L1 del VPH-11 intactas y de los viriones de VPH-11. Estos resultados respaldan la idea de que solamente la proteína L1 plegada correctamente retiene la capacidad de volver a ensamblarse para formar las VLP.

5 Para volver a ensamblar las VLP de tamaño completo eficazmente *in vitro*, los resultados descritos en el presente documento indican que la integridad estructural, la solubilidad y la homogeneidad del material de partida son significativos. Tras la generación de dicha población de capsómeros (para las VLP de VPH-11) o una mezcla de capsómeros y oligómeros de L1 correctamente plegados más pequeños y monómeros de L1 (VL de VPH-16<sub>Tr</sub>)  
10 mediante reducción con tiol, el remontaje se produjo espontáneamente tras la eliminación del agente reductor. El remontaje se logró eliminando el agente reductor de sulfhidrilo, tanto por métodos de cromatografía en columna o mediante diálisis contra un gran exceso de tampón, dando como resultado una población de VLP remontadas de tamaño completo, más homogéneas en cuanto al tamaño que el material de partida de VLP. En estudios anteriores con el virus del polioma, Salunke et al, (Id.) (1989) observaron que el montaje de las VLP a partir de los capsómeros producía múltiples montajes polimórficos icosaédricos en función de las condiciones de montaje (pH, fuerza iónica y concentración de calcio). De manera interesante, la estructura formada con más consistencia fue un icosaedro de 24 capsómeros, así como un icosaedro de 12 capsómeros, además del icosaedro de 72 capsómeros de la cápsida del virus. Los autores indican que la formación del enlace disulfuro debería ayudar al montaje de las VLP del polioma, aunque esto no es esencial, ya que a fuerza iónica elevada (sulfato de amonio 2 M) se forman cápsidas de tamaño variable, incluso en presencia de  $\beta$ -ME 15 mM. Análogamente, Li et al, (Id.) (1997), observaron que los capsómeros de VPH-11 purificados en columna expresados en *E. coli* tenían la capacidad de formar estructuras de tipo cápsida en NaCl 1 M, contra la presencia de  $\beta$ ME 15 mM. Sin embargo, aunque las condiciones de fuerza iónica aparentemente favorecen cierto grado de formación de la cápsida, es evidente de los estudios de los autores que, a fuerza iónica fisiológica, el disulfuro se une lo necesario para mantener las VLP de L1 del VPH-11 y VPH-16<sub>Tr</sub> unidas entre sí.  
25

Incluso aunque las reacciones de desmontaje se realizaran típicamente a 4°C sin agitación, es interesante que el desmontaje máximo requiriera una exposición prolongada a niveles muy elevados de agente reductor. Como se ha descrito anteriormente, la explicación más probable es que los enlaces de hidrógeno estabilizantes estén muy profundos e inaccesibles, y la exposición de estos enlaces al disolvente debido a las fluctuaciones estructurales locales sea muy infrecuente.  
30

La capacidad de volver a montar las VLP de tamaño completo de forma masiva abre numerosas posibilidades. Como se muestra en la Fig. 7, a dosis elevadas, las VLP montadas de nuevo son capaces de suscitar anticuerpos neutralizantes del virus, tal como el material de partida de VLP purificadas. Los inventores han analizado varias veces la potencia de las VLP montadas de nuevo para determinar si eran inmunógenos tan potentes como el material de partida de la VLP, que es menos homogéneo en lo que respecta al tamaño de partícula. Aunque se observan numerosas partículas de diferentes tamaños y formas en el núcleo de las células tras la infección *in vivo* (Kiselev et al, J. Mol. Biol., 40:155-171, (1969)), presuntamente solamente el virus de tamaño completo es productor de la infección. Como se ha descrito, las VLP remontadas sujeto pueden mostrar potencialmente una mayor estabilidad debido al método sujeto que proporciona partículas de VLP más uniformes. Además, como se ha descrito anteriormente, la reacción de remontaje puede potenciarse adicionalmente variando la concentración de proteína, el pH, la fuerza iónica y la cinética, para optimizar el remontaje en una amplia gama de condiciones de partida. Finalmente, la invención sujeto permite el empaquetamiento de compuestos exógenos dentro de las VLP realizando la reacción de remontaje en presencia de una solución concentrada del compuesto seleccionado. La invención sujeto, como se ha descrito anteriormente, se puede utilizar para generar pseudoviriones para usar como sustituto de varios tipos de virus de VPH que no están actualmente disponibles, o como sistema de administración de fármacos u otros compuestos dirigidos.  
45

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir partículas análogas a virus (VLP) del virus del papiloma humano (VPH), que comprende:
- 5 (i) purificar una proteína L1 del VPH expresada de forma recombinante desmontada en presencia de al menos un agente reductor de sulfhidrilo que mantiene dicha proteína L1 del VPH expresada de forma recombinante en una forma desmontada; y
- (ii) montar dicha proteína L1 del VPH expresada de forma recombinante en partículas análogas a virus (VLP) del virus del papiloma humano mediante la eliminación u oxidación de dicho al menos un agente reductor.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde dichas VLP del virus del papiloma humano se seleccionan entre el grupo que consiste de VPH-6, VPH-11, VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-41, VPH-42, VPH-43, VPH-44, VPH-45, VPH-52, VPH-54, VPH-55, VPH-56, VPH-58, VPH-70, y mezclas de los mismos.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, donde dichas VLP del virus del papiloma humano son VLP del VPH-16.
4. El método de la reivindicación 2, donde dichas VLP del virus del papiloma humano son VLP del VPH-16 y VLP del VPH-18.
- 20 5. El método de la reivindicación 2, donde dichas VLP del virus del papiloma humano son VLP del VPH-11.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, donde dicho agente reductor de sulfhidrilo es  $\beta$ -mercaptoetanol.
7. El método de la reivindicación 1, donde la proteína L1 del VPH comprende la proteína L1 del VPH-16Tr de la que se han eliminado 34 aminoácidos del extremo C.
- 25

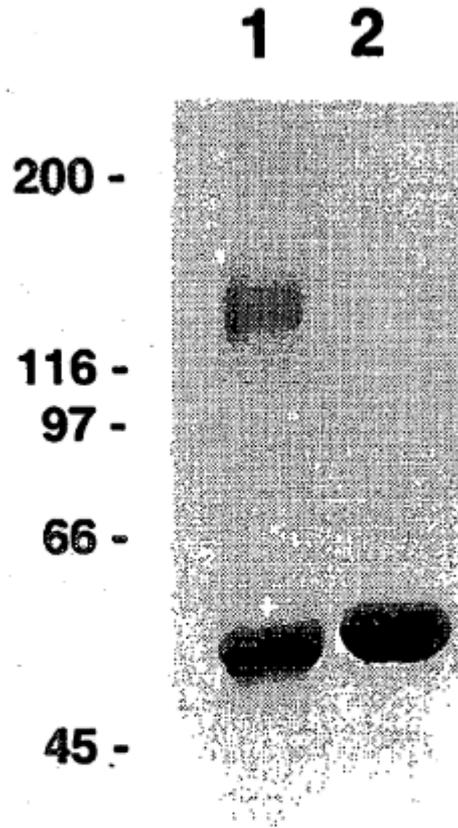


Fig. 1

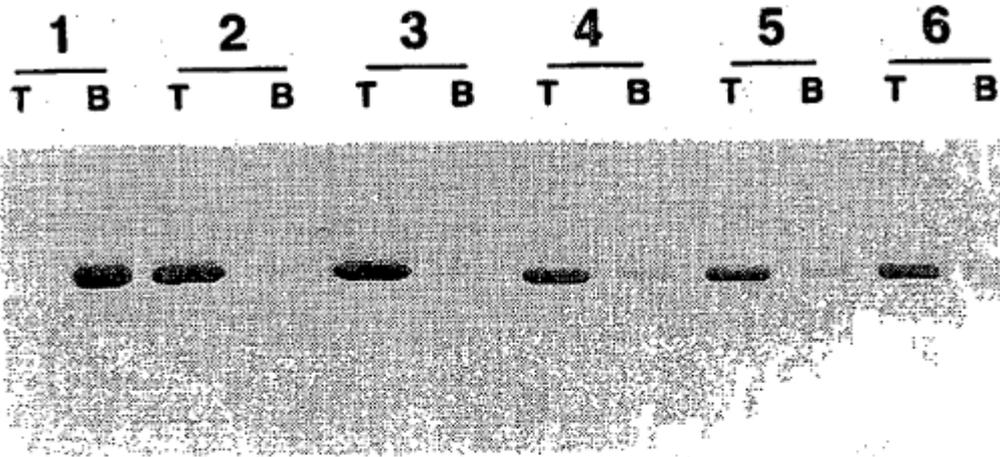


Fig. 2

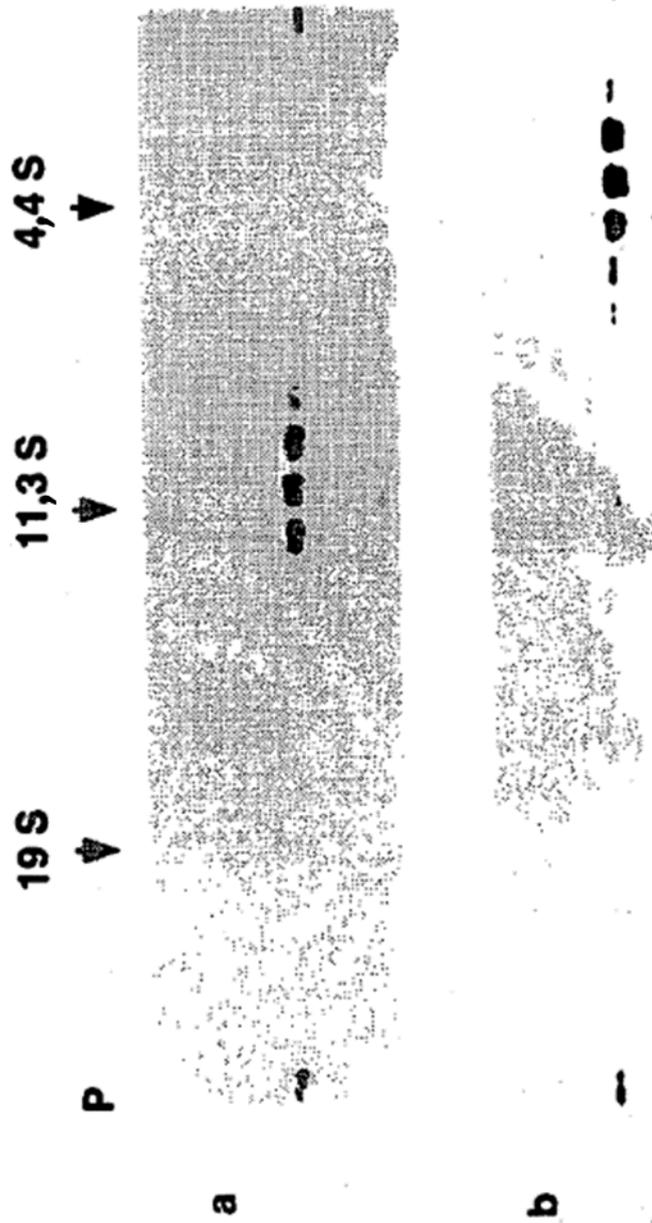


Fig. 3

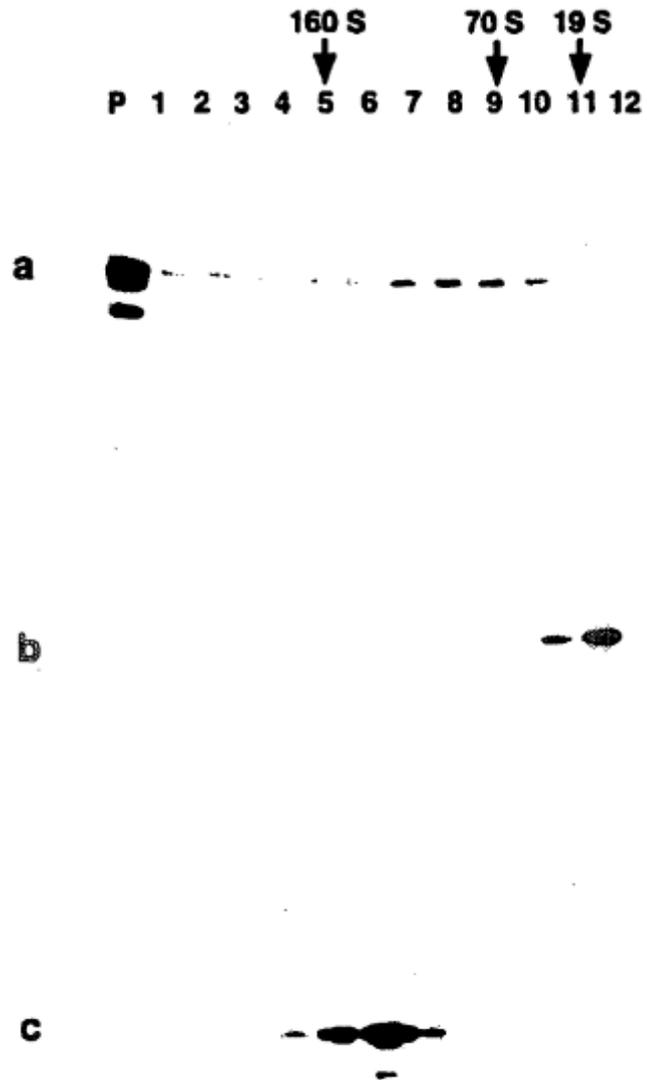


Fig. 4

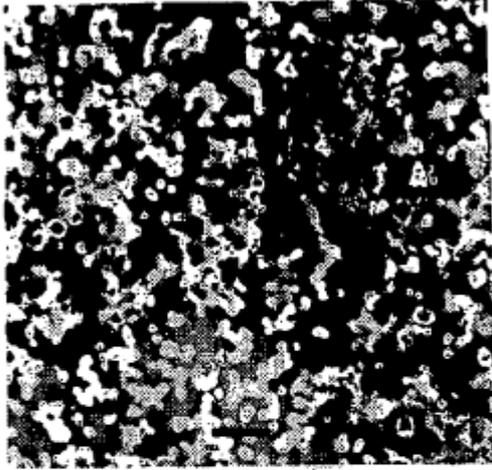


Fig. 5A

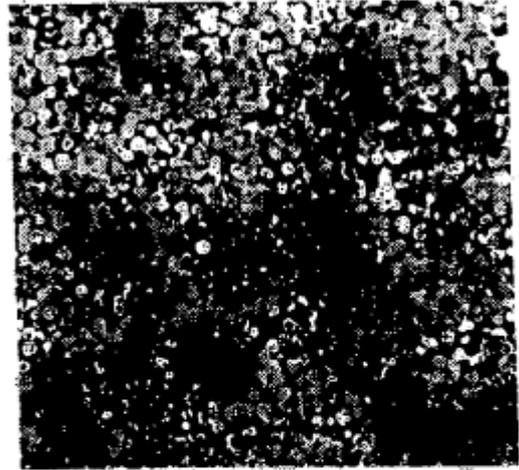


Fig. 5C

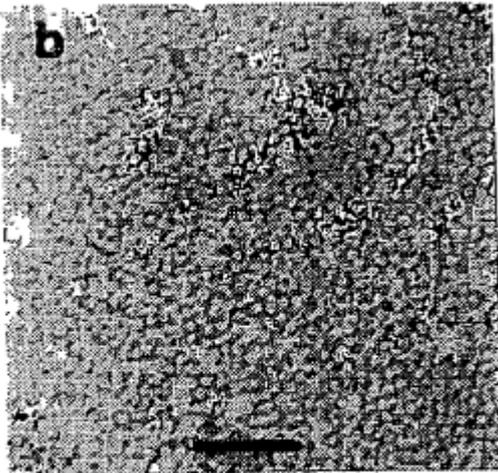


Fig. 5B

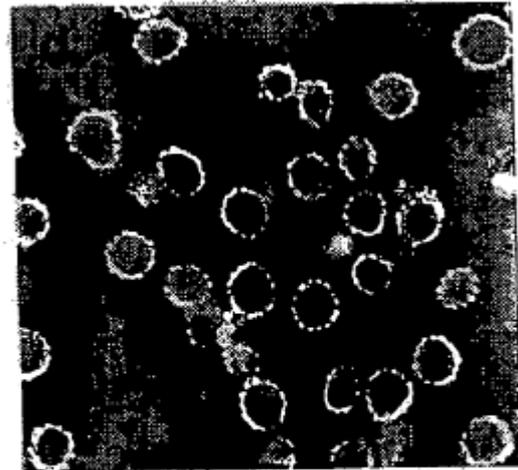


Fig. 5D

FIG. 6A

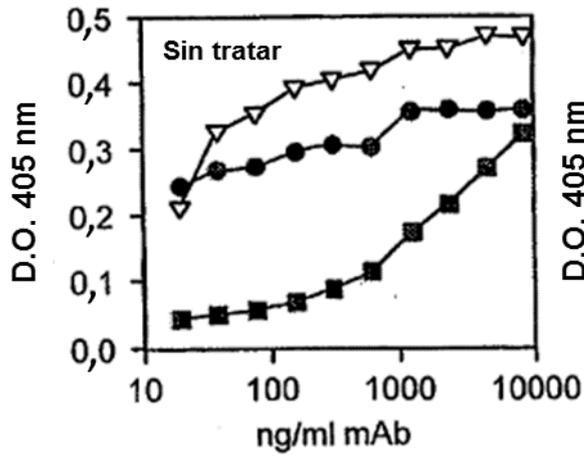


FIG. 6B

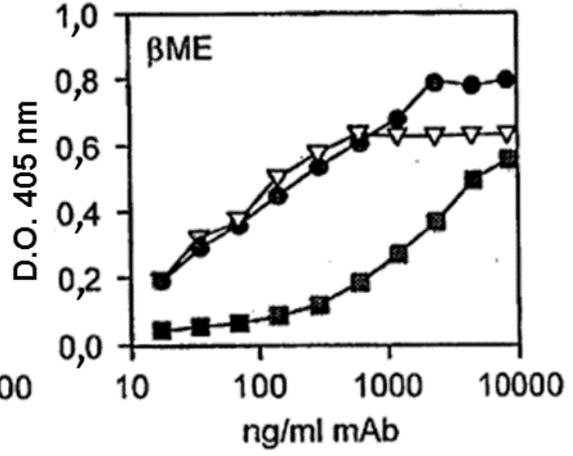


FIG. 6C

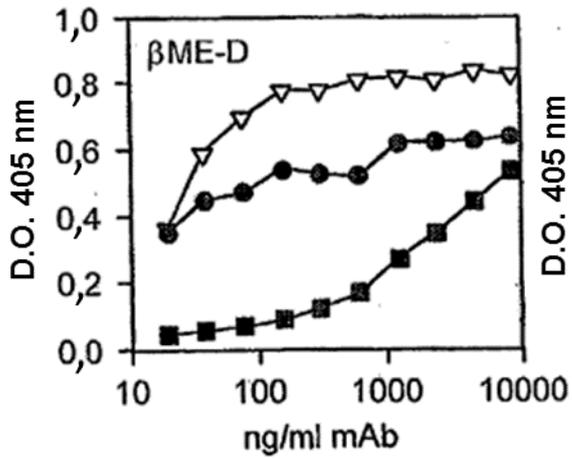
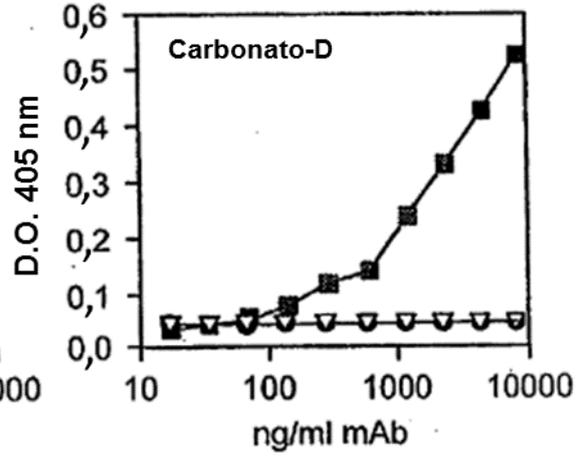


FIG. 6D



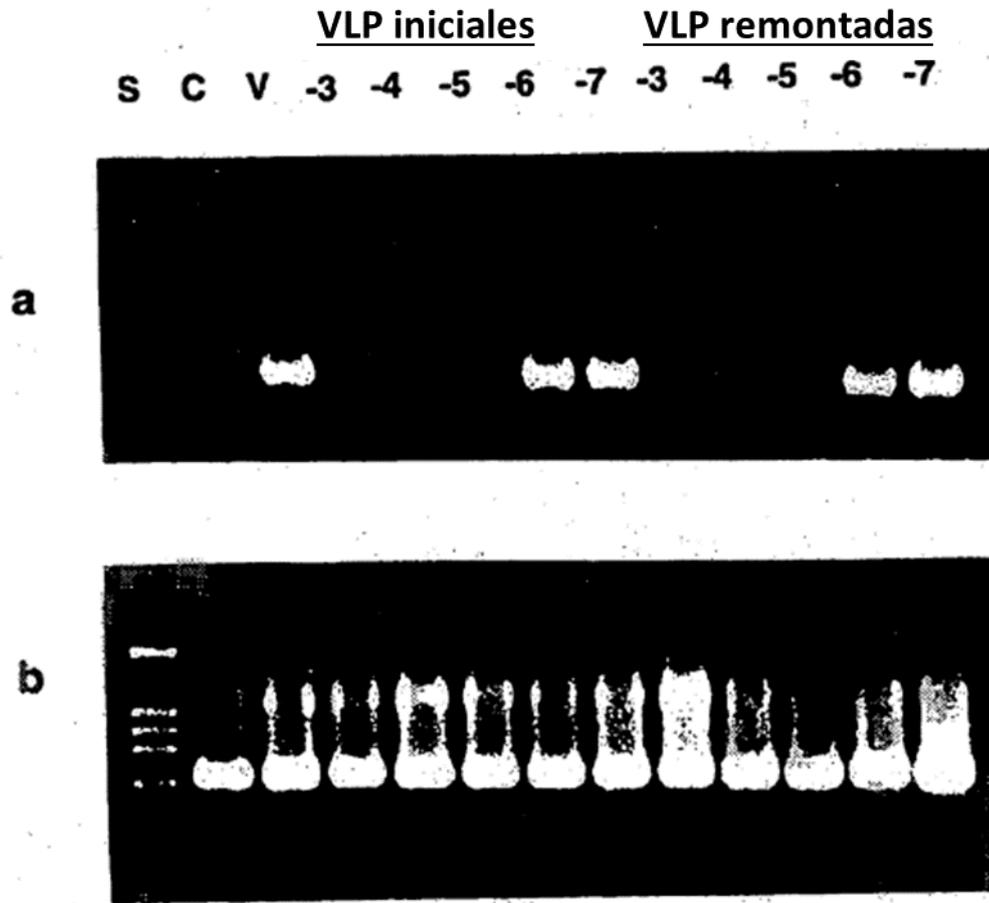


Fig. 7

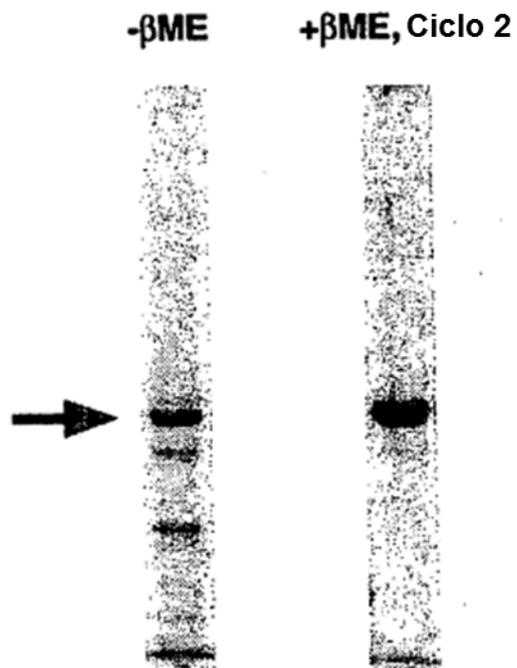


Fig. 8

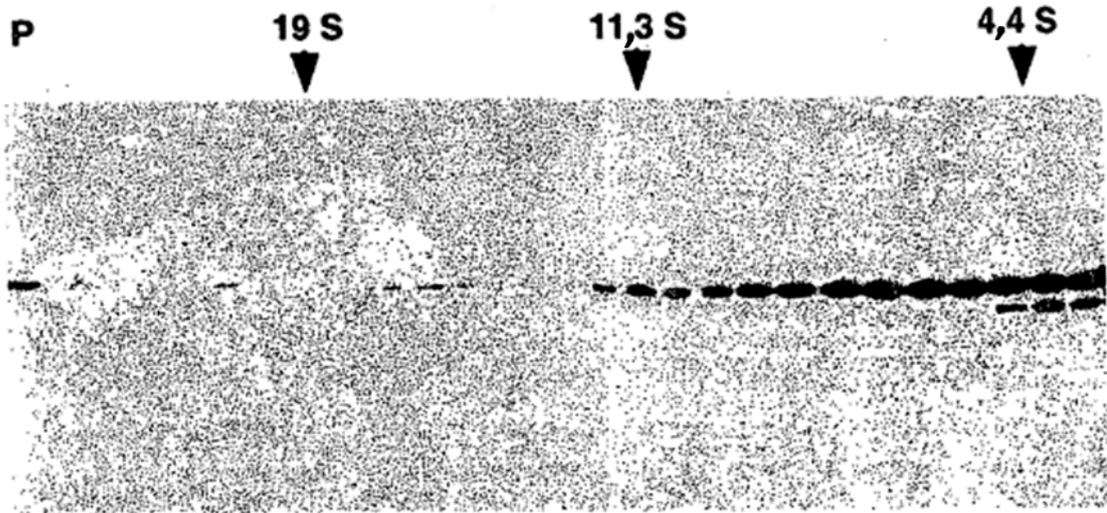


Fig. 9

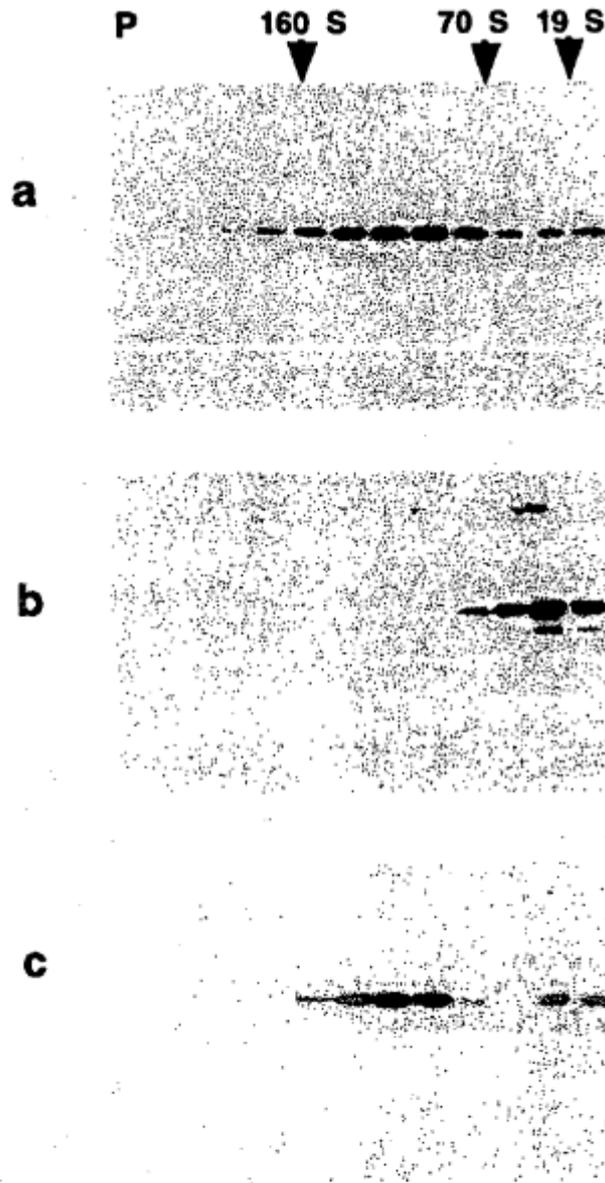


Fig. 10