

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 251**

51 Int. Cl.:

C07K 14/025 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2010 PCT/US2010/030757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10118424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2010 E 10762572 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2416798**

54 Título: **Partículas de tipo papilomavirus (VLP) como vacunas de amplio espectro del virus del papiloma humano (VPH)**

30 Prioridad:

10.04.2009 US 168445 P

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

06.02.2018

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 N. Charles Street
Baltimore MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**RODEN, RICHARD, B.S.;
KIRNBAUER, REINHARD y
SCHELLENBACHER, CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 653 251 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

Partículas de tipo papilomavirus (VLP) como vacunas de amplio espectro del virus del papiloma humano (VPH)

La presente invención se realizó con ayuda del gobierno bajo la concesión número P50 CA098252 concedida por el Instituto Nacional del Cáncer. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

5 **Estado de la técnica**

10 Los más de cien tipos de papilomavirus humanos (PVH) identificados hasta la fecha (de Villiers y col. (2004) *Virology* 22, 670-80) son los agentes etiológicos de los papilomas o verrugas de la piel y la mucosa. La infección persistente con tipos de mucosa de alto riesgo, más a menudo PVH16 y PV18, provocan cáncer de cuello de útero, que supone el segundo cáncer mortal en las mujeres de todo el mundo, provocando 274.000 muertes al año. La morbilidad sustancial es resultado de otras afecciones relacionadas con VPH que no es del cuello uterino, tales como verrugas anogenitales, cáncer de vulva, de vagina, de pene, de ano u orofaríngeo.

15 El desarrollo de vacunas profilácticas actuales de papilomavirus se inició con las observaciones de que la proteína principal L1 de la cápside expresada de manera recombinante se autoensambla en partículas de tipo virus (VLP). Estas cápsides víricas vacías están compuestas de 360 moléculas L1 y se asemejan a viriones naturales tanto en la estructura como en la inmunogenicidad, aunque no son oncogénicas ni infecciosas. Por otra parte, la VLP no se puede replicar debido a que las células en las que se generan las VLP contienen solo L1 y no otros genes de papilomavirus. Las vacunas de la subunidad de VLP inducen respuestas de anticuerpos de alto título y restringidas al tipo frente a los epítomos conformacionales de L1 (Christensen y col. (1990) *J Virol* 64, 3151-3156; Kirnbauer y col. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 12180-12184; Rose y col. (1994) *J Gen Virol* 75, 2445-9; Suzich y col. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11553-11557). Cuando se aplican a mujeres antes de la infección, las vacunas disponibles dirigidas a los tipos de alto riesgo más prevalentes, VPH16 y VPH18, han demostrado hasta el 100 % de eficacia frente a la infección persistente y la enfermedad provocada por los tipos incluidos, y por tanto son potencialmente capaces de evitar aproximadamente el 70 % de las displasias de cuello uterino de grado alto y probablemente los cánceres. Por lo tanto, el uso de las vacunas de L1 actualmente autorizadas requiere la continuación del examen colectivo citológico del cuello uterino de las mujeres. La prevención del 96 % del cáncer de cuello de útero requeriría la inmunidad frente a 7 tipos de VPH de alto riesgo (16 / 18 / 31 / 33 / 45 / 52 / 58) (Munoz y col. (2004) *Int J Cancer* 111, 278-85) y el desarrollo de vacunas de VLP de L1 más altamente multivalentes (y presumiblemente costosas).

30 La búsqueda de inmunógenos alternativos de espectro más amplio llamó la atención sobre la proteína menor L2 de la cápside, que es inmunogénicamente subdominante en el ámbito de las cápsides de L1 más L2 coexpresadas (Roden y col. (2000) *Virology* 270, 254-257). La inmunización de los animales con el péptido amino (N)-terminal de L2 demostró su capacidad para generar anticuerpos neutralizantes de bajo título que protegen frente a la exposición con los tipos de papilomavirus (PV) relacionados *in vivo* (Embers y col. (2002) *J Virol* 76, 9798-805; Gaukroger y col. (1996) *J Gen Virol* 77 (Pt 7), 1577-83), los tipos de VP heterólogos de neutralización cruzada *in vitro* (Kawana y col. (1999) *J Virol* 73, 6188-90; Pastrana y col. (2005a) *Virology* 337, 365-72; Roden y col. (2000) (anteriormente citado)), y confieren protección cruzada *in vivo* (Gambhira y col. (2007a) *J Virol* 81, 11585-92).

El documento WO 2009/001867 desvela un antígeno de vacuna capaz de inducir un anticuerpo de reacción cruzada y neutralizante dirigido frente a un papilomavirus humano de tipo de alto riesgo.

40 Kazunari Kondo en *Journal of Medical Virology* 80 (2008) 841-846 desvelan una modificación de la vacuna de la partícula de tipo papilomavirus humano mediante la inserción de los epítomos L2 de reacción cruzada.

Arvind Varsani y col. en *Journal of Virology* 77 (2003) 8386-8393 desvelan partículas L1 quiméricas de tipo papilomavirus humano 16 que presentan el epítomo neutralizante común para la proteína de la cápside menor L2 del VPH-6 y del VPH-16.

45 Stefanie D. Roth y col. en *Virology Journal* 3 (2006) 83 desvela la caracterización de los epítomos neutralizantes en la proteína de la cápside principal del papilomavirus humano de tipo 33.

Existe una necesidad por desarrollar inmunógenos o vacunógenos que presentan anticuerpos neutralizantes de alto título frente a un amplio espectro de tipos de VPH.

Breve descripción de las figuras

50 La **Figura 1** muestra un resumen de las proteínas de fusión L1-L2 A-J. Los péptidos de L2 del VPH16 con los restos de aminoácidos indicados se insertaron en el bucle DE de la proteína L1 del BPV1 (entre los restos 133/134) o de la proteína L1 del VPH16 (entre los restos 136/137). Las líneas sólidas indican proteínas L1. Las barras abiertas indican los péptidos de L2. * Indica 2 aminoácidos (Pro y Arg) añadidos en N- y en C-terminal al respectivo péptido resultante de los sitios de enzima de restricción usados para la clonación. Los esquemas no se han dibujado a escala.

La **Figura 2a** muestra un análisis de las proteínas de fusión quiméricas (mediante análisis por transferencia de Western) de los lisados de células Sf-9 infectadas mediante baculovirus recombinante. La L1 del BPV1 detectada con el MAb AU1 o Camvir-1 o la L1 del VPH16 de la VLP quimérica como las bandas principales en un rango de 45-60 KD. La reactividad a bandas de MW bajas se debe probablemente a los productos de degradación proteolítica. Ambos mAb no fueron reactivos con los lisados de las células Sf-9 sin infectar o con las células de insecto infectadas por baculovirus ts (AcMNPV). El tipo silvestre de las proteínas L1 del BPV1 o L1 del VPH16 se usaron como controles. La **Figura 2b** muestra la antigenicidad de los péptidos de L2 incorporados se verificó con el mAb RG-1 (A, B, J) o los sueros policlonales de conejo para los aa 1-88 de la L2 del VPH16 (C), y los aa 11-200 de L2 del VPH16 (D, E, F, G, H, I) respectivamente. D, E y F se usaron como proteínas de fusión purificadas por gradiente.

La **Figura 3** muestra la microscopía electrónica de transmisión (MET) de las preparaciones de partículas purificadas, X 30.000: Las proteínas quiméricas 18-31 (A), 17-36 (B), 2-22 (C), 75-112 (E), 115-154 (F), 149-175 (G) y 172-200 (H) de BL1-16L2 y 17-36 (J) de 16L1-16L2 se ensamblan en VLP, con un tamaño de aproximadamente 50-60 nm. La 35-75 (D) de BL1-16L2 y 13-107 (I) de BL1-16L2 no forman de manera inequívoca capsómeros o VLP.

La **Figura 4** muestra las inmunizaciones de L1 de BPV-17-36 de la L2 del VPH16 (BL1-16L2) de conejos y ratones, usando el adyuvante de Freund o alumbre-MPL y las inmunizaciones de L1 del HPV16-L2 del HPV16 (16L1-16L2) de conejos, usando el adyuvante alumbre-MPL: Evaluación mediante ELISA del péptido L2. Los ELISA se realizaron por triplicado para diluciones de suero seriadas de 5 veces de 100 a 7.812.500. Los ELISA se realizaron usando el péptido sintético de los aa 18-31 de la L2 del VPH16 como antígeno. Los datos del antisuero de la 17-36 de BL1-16L2 indican títulos de anticuerpos específicos de L2 de 62.500-312.500 en NZW usando Freund como adyuvante (**Fig. 4a**), títulos de 12.500 en NZW usando alumbre-MPL (**Fig. 4b**), y títulos de 2.500-12.500 en Balbc usando Alumbre-MPL como adyuvante (**Fig. 4c**). Los datos de los antisueros de 17-36 de 16L1-16L2 indican títulos de anticuerpo específicos de L2 de 12.500 en NZW usando alumbre-MPL (**Fig. 4d**). El MAb RG-1 se dirige contra los aa 17-36 (18) de la L2 del VPH16. Los datos se muestran como la media de DO⁺-DT.

La **Figura 5** muestra la neutralización de los viriones del VPH2a naturales mediante antisueros para RG1-VLP ((17-36) de L1/L2 del VPH16)) (Ensayo de neutralización RT-PCR). Los viriones del VPH2a se aislaron de una verruga plantar humana, incubada en presencia o ausencia de los sueros indicados a una dilución final de 1:400, y se añadieron a células HaCaT (carriles 2-6). El ARN se transcribió inversamente en ADNc y el ARN vírico cortado y empalmado se detectó mediante dos rondas de PCR anidada, y el ARN de beta actina se detectó mediante una ronda de PCR como un control. Carril 1, solo células HaCaT; Carril 2, solo VPH2, sin suero añadido; Carril 3, anti-VLP de L1 del VPH2; Carril 4, anti-VLP-RG1 preinmunitario; Carril 5, anti-VLP-RG1 inmunitario; Carril 6, anti-VLP de L1ts/L2ts del VPH16. Los sueros se ensayaron a una dilución final de 1:400.

La **Figura 6** muestra una alineación de secuencias de los péptidos de L2 de múltiples (no todos) tipos de papilomavirus humano y de animales que se corresponden con los aminoácidos 17-36 de la L2 del VPH16. Las secuencias en la Tabla, desde arriba hacia abajo, se representan con las SEQ ID NO:3 a 23.

Descripción

Los presentes inventores demuestran en el presente documento que varios péptidos L2 epítomos del extremo N-terminal de la proteína L2, por ejemplo, el péptido de aproximadamente los restos de aminoácidos 17-36 de la L2 del VPH16, o secuencias comparables (equivalentes) de otros tipos de papilomavirus (PV), cuando se incorporan en el bucle de superficie DE de la proteína L1 del papilomavirus (PV), forman proteínas de fusión (quiméricas) recombinantes que se ensamblan en VLP; y que esta VLP de L1-L2, cuando se introduce en animales, induce respuestas de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro para un intervalo amplio de papilomavirus de mucosa de alto riesgo, de bajo riesgo, cutáneos y beta. Las respuestas inmunitarias fuertes y duraderas se consideran mayores que la de la proteína de fusión lineal. Sin desear quedar ligado a ningún mecanismo particular, se sugiere que estas respuestas inmunitarias fuertes son resultado de la exposición del epítipo sobre la matriz de repetición densa de la VLP.

Los inventores también sugieren que el péptido de los restos de aminoácidos 17-36 de la L2 del VPH16, o las secuencias comparables (equivalentes) de otras cepas de papilomavirus (PV), cuando se introducen en otros sitios de la L1, de manera que el péptido L2 se expone sobre la superficie de la VLP que se forma, también se ensambla en una VLP quimérica de L1-L2 que, cuando se introduce en animales, induce respuestas de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro para un intervalo amplio de papilomavirus de mucosa de alto riesgo, de bajo riesgo, cutáneos y beta.

Por lo tanto, la secuencia particular del péptido de L2, y/o el sitio de L1 en el que se introduce el péptido de L2, son factores que contribuyen a la inducción de una reactividad cruzada/neutralización fuerte, de amplio espectro de las VLP de la invención.

En aspectos de la invención, una o más de las composiciones de VLP de la invención se usan como una composición inmunogénica o de vacuna. En realizaciones de la invención, se puede usar una composición de VLP

para la profilaxis (por ejemplo, la prevención) o el tratamiento de la infección por papilomavirus y la enfermedad asociada y/o se puede combinar con un vehículo farmacéutico. En ciertos aspectos, se administra una composición a un individuo antes de, después, y/o durante la exposición al virus para minimizar o evitar la infección vírica o para reducir la gravedad de la infección y retrasar o detener la progresión de la enfermedad, o para evitar la transmisión de un virus desde el hospedador infectado a otro individuo que no tiene tal infección vírica mediante la vacunación del hospedador infectado o el individuo no infectado.

Las ventajas de las composiciones de VLP de la invención, y los procedimientos para usarlas para inmunizar sujetos, incluyen que los restos de L2 generan respuestas de anticuerpos neutralizantes frente a un amplio espectro de VPH, sin interferir con la capacidad de las VLP para inducir niveles de anticuerpos anti-L1 de alto título. El vehículo de vacuna de la L1 de la VLP es bien tolerado y proporciona inmunogenicidad a largo plazo (al menos 6 años desde la fecha). Por lo tanto, las vacunas basadas en la VLP de la L1 del VPH16 como vehículo para epítomos de L2 ofrecen la ventaja de inducir, con una única construcción, tanto anticuerpos de tipo restringido para la L1 del VPH16, así como anticuerpos anti-L2 neutralizantes de reacción cruzada. La amplia reactividad cruzada reduce la necesidad de ensayos de examen colectivo para determinar la infección por VPH y/o la neoplasia intraepitelial, y reduce la necesidad de preparar formulaciones altamente multivalentes de vacunas de la VLP de la L1 para abarcar todas las enfermedades que provocan los tipos de VPH, reduciendo de este modo el coste. Las composiciones de la invención proporcionan una vacuna de bajo coste, ampliamente protectora que es estable, se puede producir a gran escala y se puede suministrar sin agujas. El bajo coste permite el uso en países en desarrollo, en donde tiene lugar el 80 % de la carga de cáncer de cuello de útero.

La presente invención se relaciona, por ejemplo, con una composición de partícula de tipo virus (VLP) ensamblada a partir de (que comprende, que consiste en) un polipéptido quimérico que comprende una proteína L1 de papilomavirus (PV), en la que se inserta un péptido expuesto en superficie que consiste en la siguiente secuencia de una proteína L2 de papilomavirus:

a) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV (SEQ ID NO:9) o

b) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:56) o

c) LYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:57)

en donde el péptido L2 se inserta en el bucle DE de la proteína L1.

Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, el término "ensamblado a partir de un polipéptido quimérico", tal como se usa anteriormente, abarca más de un polipéptido quimérico.

En primer lugar, se estableció una secuencia consenso para esta porción de L2 por uno de los presentes inventores y colaboradores en Gambhira y col. (2007b) J Virol 81, 13927-31, alineando las secuencias altamente conservadas en esta porción de la proteína L2 a partir de una variedad de especies de PV. Esta alineación original se muestra en la Figura 6 en el presente documento, y está publicada en color como la Fig. 1A en el artículo Gambhira (2007b), que se incorpora en el presente documento a modo de referencia, de manera específica con referencia a esa figura y a la secuencia consenso que deriva de la misma. Posteriormente, los presentes inventores han extendido la alineación para incluir variedades adicionales de especies de PV, tal como se muestran en la Tabla 1 a continuación, y han modificado las secuencias consenso en consecuencia. Las secuencias consenso modificadas se representan por la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2.

Tabla 1

El epítomo RG1 (17 - 36 de la L2) de la L2 del VPH16 está altamente conservado entre los VPH de tipo mucosa (tipos de alto riesgo subrayados) y piel e inducen neutralización cruzada (✓)

SEQ ID (NO:)	Secuencia	Comparación	Resultado
(NO:9)	QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV	RG1 (17 - 36 de la L2) del <u>VPH16</u>	✓
(NO:24)	QLYKTCKQAGTCPPDVIPKV	VPH73 (95 %)	
(NO:25)	QLYKTCKQSGTCPPDIIPKV	VPH34 (95 %)	
(NO:26)	QLYKTCKQAGTCPPDVIPKI	Ursus maritimus (oso polar) PV (90 %)	
(NO:22)	DLYRTCKQAGTCPPDVIPKV	PV 1/2 bovino (89 %)	✓
(NO:27)	DLYRTCKQAGTCPPDVIPKV	VPH72 (89 %)	
(NO:28)	DLYRTCKQAGTCPPDIIPRV	VPH2 (89 %)	✓
(NO:29)	DLYRTCKQAGTCPPDIIPRL	VPH27 (89 %)	
(NO:30)	DLYRTCKQAGTCPPDIIPRV	VPH57 (89 %)	
(NO:16)	QLYRTCKAAGTCPPDVIPKV	<u>VPH35</u> (85 %)	

(continuación)

El epítipo RG1 (17 - 36 de la L2) de la L2 del VPH16 está altamente conservado entre los VPH de tipo mucosa (tipos de alto riesgo subrayados) y piel e inducen neutralización cruzada (√)

(NO:31)	ELYKTCKAAGTCPPDVIPKV	VPH77 (85 %)	
(NO:32)	QLYQTCKAAGTCPPDVIPKV	VPH67 (85 %)	
(NO:33)	QLYRTCKAAGTCPPDVIPKV	VPH3 (85 %)	√
(NO:34)	QLYRTCKAAGTCPPDVIPKV	VPH28 (85 %)	
(NO:35)	ELYKTCKSAGTCPPDVIPKV	VPH29 (85 %)	
(NO:36)	QLYSTCKAAGTCPPDVIPKV	VPH82 (85 %)	
(NO:37)	QLYQTCKAAGTCPSDIIPKV	VPH44 (85 %)	
(NO:38)	QLYQTCKAAGTCPSDIIPKV	VPH55 (85 %)	
(NO:39)	QLYQTCKAAGTCPPDVVINKV	VPH7 (80 %)	
(NO:10)	DLYKTCKQSGTCPPDVVPKV	<u>VPH18</u> (80 %)	√
(NO:40)	QLYRTCKASGTCPPDVIPKV	VPH117 (80 %)	
(NO:41)	QLYRTCKASGTCPPDVIPKV	VPH94 (80 %)	
(NO:42)	QLYRTCKASGTCPPDVIPKV	VPH10 (80 %)	
(NO:43)	ELYKTCKQSGTCPPDVINKV	<u>VPH68</u> (80 %)	
(NO:44)	DLYRTCKAAGTCPPDVIPKV	VPH102 (80 %)	
(NO:14)	QLYQTCKASGTCPPDVIPKV	<u>VPH52</u> (80 %)	√
(NO:15)	QLYQTCKASGTCPPDVIPKV	<u>VPH58</u> (80 %)	√
(NO:45)	DLYKTCKAAGTCPPDVIPKI	<u>VPH69</u> (80 %)	
(NO:46)	DLYKTCKAAGTCPPDVIPKI	VPH26 (80 %)	
(NO:47)	QLYQTCKASGTCPPDVIPKV	VPH42 (80 %)	
(NO:48)	QLYQTCKASGTCPPDVIPKV	VPH13 (80 %)	
(NO:7)	QLYQTCKLTGTCTPPDVIPKV	VPH6 (80 %)	√
(NO:8)	QLYQTCKATGTCTPPDVIPKV	VPH11 (80 %)	√
(NO:13)	QLYQTCKATGTCTPPDVIPKV	<u>VPH33</u> (80 %)	√
(NO:49)	DLYRTCKQSGTCPPDVVPKV	VPH61 (75 %)	
(NO:5)	HIYQTCKQAGTCPPDVINKV	VPH5 (75 %)	√
(NO:6)	HIYQTCKQAGTCPPDVINKV	VPH8 (75 %)	
(NO:12)	QLYQTCKAAGTCPSDVIPKI	<u>VPH31</u> (75 %)	√
(NO:11)	DLYRTCKQSGTCPPDVINKV	<u>VPH45</u> (75 %)	√
(NO:50)	QLYQTCKASGTCPPDVIPKI	VPH32 (75 %)	√
(NO:51)	HIYQSCKAAGTCPPDVLNKV	VPH76 (60 %)	√
(NO:52)	DIYRGCKASNTCTPPDVINKV	VPH38 (55 %)	∅
(NO:3)	DIPSCKISNTCTPPDIQNKI	VPH1 (50 %)	
(NO:53)	NLYAKCQLSGNCLPDVKNKV	VPH4 (50 %)	
(NO:21)	DIYPTCKIAGNCPADIQNKF	CRPV (55 %)	∅

La secuencia de L2 puede provenir de cualquiera de una variedad de especies de PV. Los péptidos de L2 típicos que son adecuados incluyen, por ejemplo, los enumerados en la Figura 6 y en la Tabla 1. En una realización de la invención, los péptidos de L2 se seleccionan a partir de péptidos que se muestran en el presente documento como de reacción cruzada (de neutralización cruzada). En otras realizaciones de la invención, los péptidos de L2 se seleccionan de los tipos de mucosa de alto riesgo (por ejemplo, los tipos más comunes que provocan cáncer de cuello de útero: VPH 16, 18, 31, 33, 45, 52 o 58) o del VPH de tipo piel. Por ejemplo, los péptidos de L2 adecuados incluyen:

5

el péptido de los aminoácidos 17-36 de la proteína L2 del VPH16, que tiene la secuencia de aminoácidos QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV (SEQ ID NO:9)

10

En realizaciones del presente aspecto de la invención, el péptido L2 se inserta en un bucle de la proteína L1 de manera que el péptido L2 se presentará sobre la superficie de la VLP que forma. El péptido de L2 se inserta en el bucle DE de la proteína L1.

15

En realizaciones de la invención, la proteína L1 es del VPH16 (que incluye una variante de VPH16 que no es la variante 114K, que se ejemplifica en el presente documento), y el péptido L2 se inserta entre los aminoácidos 136 y 137 en el bucle DE de la proteína L1 (la secuencia de la proteína L1 del VPH16 es la SEQ ID NO:85); o

la proteína L1 es del BPV1, y el péptido L2 se inserta entre los aminoácidos 133 y 134 en el bucle DE de la proteína L1 (la secuencia de la proteína L1 del BPV16 es la SEQ ID NO:83).

En realizaciones de la invención, el péptido insertado en el bucle DE consiste en la siguiente secuencia de la proteína L2 del VPH16 (aminoácidos 17-38): QLYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:56); o una variante de la SEQ ID NO:56 que carece de un aminoácido del extremo N-terminal y/o de uno o dos aminoácidos del extremo C-terminal. Tales variantes de péptidos son el péptido L2 del VPH16 (17-36) que tiene la secuencia QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV (SEQ ID NO:9), y el péptido L2 del VPH16 (18-38) que tiene la secuencia LYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:57).

En realizaciones del presente aspecto de la invención, en las que el péptido de L2 se inserta en el bucle DE de la L1, la proteína L1 es del VPH16, y el péptido L2 se inserta entre los aminoácidos 136 y 137 en el bucle DE de la proteína L1. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos completa de la L1 del VPH16 se proporciona en alguna parte del presente documento, como la SEQ ID NO:85; o

la proteína L1 es del BPV1, y el péptido de L2 se inserta entre los aminoácidos 133 y 134 en el bucle DE de la proteína L1. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos completa de la L1 del BPV1 se proporciona en alguna parte en el presente documento, como la SEQ ID NO:83.

Para cualquiera de las composiciones de VLP de la invención, se puede usar una variedad de combinaciones de proteínas/péptidos de L1 y L2. Por ejemplo,

las proteínas L1 y L2 pueden ser de un papilomavirus humano (VPH);

la proteína L1 puede ser de un BPV, tal como BPV1, el muy estrechamente relacionado BPV2, u otro de los al menos 10 tipos de BPV que se han identificado (por ejemplo, BPV4); o

la proteína L1 y/o la proteína L2 pueden ser de otro PV que no sea un VPH.

En aspectos de la invención, la proteína L1 es una variante de la L1 ejemplificada en el presente documento. Algunas de tales variantes se tratan en alguna parte del presente documento. Entre estos se incluyen, por ejemplo, las quimeras de los genes de L1 que provienen de diferentes tipos de VPH como la estructura, así como las versiones truncadas de L1 que se ensamblan en VLP o capsómeros.

En aspectos de la invención, una VLP de la invención es una composición inmunogénica, que, por ejemplo, induce una respuesta inmunitaria humoral o celular, específica de antígeno o innata. Una VLP de la invención puede ser inmunogénica frente a 1, 2, 3, 4, 5 o más de papilomavirus de tipo de mucosa de alto riesgo (por ejemplo, VPH 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, 68 o 76), de tipo de mucosa de bajo riesgo (por ejemplo, VPH6 y 11), VPH13 y 32 que causan la enfermedad de Heck (hiperplasia epitelial focal de la mucosa oral), los de tipo cutáneo de bajo riesgo (tipos dermatotrópicos) que provocan verrugas en la piel (por ejemplo, el VPH1, 2, 3, 4, 7, 10, 27, 57, etc.) y/o los de tipo cutáneo beta (por ejemplo, el VPH5, 8, 9, 12, 14, 15, 38, etc. de tipo beta), o los tipos de papilomavirus de animales. Con relación a la nomenclatura de los PV, todos los PV beta son de tipo cutáneo. Sin embargo, los de tipo cutáneo se citan normalmente como los que inducen verrugas comunes, palmares, plantares o planas (estos se encuentran en el género alfa, gamma, mu, nu). Los de tipo beta generalmente inducen solo verrugas en la piel (o cáncer de piel) en pacientes de EV o en pacientes inmunosuprimidos.

Otro aspecto de la invención es una composición de VLP o de capsómero de la invención que comprende adicionalmente un adyuvante o una vacuna que comprende una composición de VLP de la invención y un adyuvante. Una vacuna de la invención puede ser eficaz frente a los papilomavirus humanos (por ejemplo, frente a los papilomavirus de mucosa de alto riesgo, de bajo riesgo, cutáneos y beta (por ejemplo, el betatipo VPH5)). Una vacuna de la invención se puede formular de una variedad de formas, incluyendo una forma liofilizada o en polvo, una formulación para la administración por inhalación, ingestión (por ejemplo, como una píldora), en un vector vírico o bacteriano, o como un componente de un lubricante sexual. Un modo de administración es similar al de las vacunas de VPH que existen en la actualidad, para inoculación i.m. con adyuvante (por ejemplo, alumbre o alumbre-MPL). Para la administración en países en desarrollo, que pueden carecer de una adecuada refrigeración, las formulaciones para vectores liofilizados, de inhalación, ingestión o virales o bacterianos pueden ser más adecuadas.

Otro aspecto de la invención es un polipéptido quimérico, que comprende una proteína L1 de papilomavirus (PV) (por ejemplo, una proteína L1 del VPH16) en la que se inserta un péptido expuesto en superficie que consiste en una de las siguientes secuencias de una proteína L2 de papilomavirus:

- a) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV (SEQ ID NO:9) o
- b) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:56) o
- c) LYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:57)

en donde el péptido L2 se inserta en el bucle DE de la proteína L1

Otros aspectos de la invención son un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN, un ARN u otras formas de ácido nucleico) que codifica un polipéptido de la invención; un vector de expresión (por ejemplo, derivado de secuencias reguladoras víricas o bacterianas) que comprende tal ácido nucleico, que está unido de manera operativa a una secuencia de control de la expresión; y una célula hospedadora que comprende tal polipéptido, ácido nucleico o vector de expresión.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para preparar una composición de VLP o capsómero, que comprende incubar un polipéptido quimérico como el anterior en condiciones adecuadas para el autoensamblaje.

5 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para inmunizar o vacunar a un sujeto frente al PV (por ejemplo, VPH), que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de VLP o capsómero de la invención.

Otro aspecto de la invención es un uso de la VLP para inducir una respuesta inmunitaria frente al VPH en un sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta inmunitaria celular, específica de antígeno o innata.

10 Otro aspecto de la invención es un uso de la VLP para tratar una infección por PV en un sujeto que tiene una infección por PV o en riesgo de estar expuesto al PV.

15 Otro aspecto de la invención es un uso de la VLP para la prevención de cáncer de cuello uterino, o cáncer orofaríngeo, o un precáncer, en un sujeto. "Precáncer", tal como se usa en el presente documento, se refiere a precursores de cánceres de cuello uterino y otros cánceres anogenitales, tales como lesión intraepitelial de grado alto y de grado bajo, HSIL, LSIL (o CIN, VIN, AIN etc., con relación a las regiones anatómicas cuello uterino, vulva y anal, respectivamente). Ya se sabe que estas afecciones se evitan mediante las vacunas de VLP de la L1 actuales, y se podría esperar que se evitasen mediante las composiciones de VLP de la presente invención.

Otro aspecto de la invención es un kit que comprende una composición de VLP de la invención.

20 También se desvela un anticuerpo o suero inmunológico profiláctico o terapéutico generado mediante la vacunación con una composición de VLP de la invención, que se puede administrar a un sujeto sano o enfermo, respectivamente, para prevenir o tratar una infección por PV.

25 Otro aspecto de la invención es una composición de capsómero, que comprende un polipéptido quimérico L1/L2 de la invención que se ha autoensamblado en un capsómero (capsómero, subunidad estructural de L1 pentamérica) en lugar de en una VLP. Los procedimientos para generar tales capsómeros son convencionales en la materia. Véase, por ejemplo, J Virol Enero de 1998; 72(1):32-41; J Virol Marzo de 1998; 72(3):2160-7; Thones y col. (2007) Virology 369, 375-388, o Bishop y col. (2007), The Journal of Bioological Chemistry 282, 31803-31811. Un modo de generar capsómeros es truncar una proteína L1, o usar un gen de L1 mutado (por ejemplo, que lleva las mutaciones C175A y C428A), que inhibe su capacidad para formar una VLP. Véase, por ejemplo, J Mol Bio 16 de Marzo de 2001;307(1):173-82; J Virol Abril de 1997;71(4):2988-95.

30 Otro aspecto de la invención es un uso de la VLP para inducir una reacción inmunológica para (protegerse frente a la infección por) los VPH de la piel de tipo alfa (por ejemplo, VPH2, 3) en un sujeto.

35 El VPH2 está estrechamente relacionado con los tipos VPH27 y 57, que junto con el VPH1 son los tipos que se encuentran más comúnmente en las verrugas de la piel. El VPH3 y el tipo estrechamente relacionado VPH10, son de tipo cutáneo alfa de bajo riesgo que se encuentran comúnmente en las verrugas planas, tanto en pacientes inmunocompetentes como en pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, por trasplante de riñón) o en pacientes de EV.

40 Una "partícula de tipo virus (VLP)" quimérica de la invención, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cápside vírica vacía que está compuesta por moléculas de proteína L1 de papilomavirus, en la que se inserta un péptido de la cápside vírica menor, L2. Los péptidos insertados se insertan en una región adecuada de la proteína L1, de manera que se presenten en la superficie de la VLP. El péptido L2 se inserta en el bucle DE de la L1, por ejemplo, entre los aminoácidos 133 y 134 del BPV1, entre los aminoácidos 136 y 137 de la L1 del VPH16, o entre sitios equivalentes de las moléculas L1 de otros papilomavirus. El péptido insertado comprende uno o más epítomos (por ejemplo, epítomos neutralizantes) que son de reacción cruzada con un amplio espectro de tipos de PV. En una realización, el péptido L2 comprende los aminoácidos 17-36 de la proteína L2 del VPH16, o una secuencia equivalente de aminoácidos de otro papilomavirus. Las proteínas L1 quiméricas se ensamblan de manera espontánea en VLP y se asemejan a viriones naturales tanto en estructura como en inmunogenicidad, aunque carecen de ácido nucleico y, por tanto, no son oncogénicas ni infecciosas.

45 La proteína L1 en la que se inserta un péptido de L2 puede ser de cualquiera de una variedad de tipos (cepas) de papilomavirus (PV). Por ejemplo, las VLP se pueden usar para proteger cualquiera de una variedad de animales frente a la infección por PV, incluyendo, por ejemplo, ganado vacuno y cánidos; para tales VLP, la L1 puede ser de las cepas de PV de las que se sabe que infectan a estos animales, por ejemplo, BPV1, BPV2, BPV4, BPV6 o PV oral canino (COPV). En una realización, las VLP se usan para proteger a los seres humanos frente a la infección por VPH; para tales VLP, la L1 puede ser de cualquier tipo de VPH (por ejemplo, VPH 16, 18, 45, 6, 11, 1, 2, 4, 5 u 8). Como alternativa, el BPV podría ser un vehículo de vacuna adecuado para su uso en seres humanos, en particular, en pacientes que han tenido una exposición previa a la cepa del VPH típicamente usada para formar la composición de la VLP. La VLP en la que la proteína L1 deriva del BPV y el VPH 16 se ejemplifican en el presente documento; las construcciones que comprenden otras fuentes de la proteína L1 serán evidentes para un experto en la técnica.

En los Ejemplos en el presente documento, la proteína L1 es esencialmente la versión de tipo silvestre, excepto por

la inserción del péptido de la L2. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que también se pueden usar variantes de la proteína L1, siempre que la proteína pueda tolerar la inserción de un péptido de L2 adecuado, sin pérdida de su antigenicidad, y que se pueda ensamblar en una VLP, o al menos un pentámero (capsómero). Se han descrito varios ejemplos de tales variantes. Por ejemplo, se puede usar una L1 truncada, que carece de hasta 10 aminoácidos de su extremo N-terminal o que carece de hasta 30 aminoácidos de su extremo C-terminal. (Véase, por ejemplo, J Mol Bio 16 de Marzo de 2001;307(1):173-82, o Bishoop y col. (2007) The Journal of Biological Chemistry 282, 31803:31811). En otra realización, se puede usar una pequeña fusión a un péptido de aproximadamente 60 aminoácidos. (Véase, por ejemplo, Virology 21 de julio de 1997;234(1):93-111, que se incorpora a modo de referencia para la divulgación de tales péptidos de fusión). En otra realización, se pueden usar las moléculas híbridas de L1, en las que una porción de la molécula de una primera cepa de PV se intercambia por una molécula de L1 de una segunda cepa de PV. Por ejemplo, determinadas porciones funcionales de la molécula L1, tales como los "bucles" de la proteína expuestos externamente, se pueden intercambiar entre moléculas de diferentes cepas de PV. Para ejemplos de tales proteínas híbridas de L1, véase, por ejemplo, Virology 20 de Diciembre de 2001:291(2):324-34 o Oroczo y col. (2005) J Virol 79, 9503-9514. Véase, por ejemplo, J Virol Mayo de 2006;80(10):4664-72; White y col. (1999) J Virology 73, 4882-4889; o Roden y col. (1997) J Virol 71, 6247-52.

Se desvela que un péptido de L2 se puede diseñar genéticamente en una proteína L1 en cualquiera de una variedad de sitios de la proteína L1, siempre que la inserción se presente en la superficie de la VLP y que la inserción no interfiera con la antigenicidad de la proteína L1 o la capacidad de la proteína para ensamblarse en una VLP. La cristalización de la VLP de la L1 del VPH16 ha revelado la estructura atómica de la cápside vírica, en particular los bucles hipervariables de superficie que contienen los epítomos inmunodominantes y dependientes de la conformación que se reconocen por anticuerpos neutralizantes y determinan el serotipo vírico (Chen y col. (2000) Molecular Cell 5, 557-567). En consecuencia, los sitios adecuados para la inserción de un péptido de L2 en la proteína L1 serán evidentes para un experto en la técnica. Entre estos se incluyen, por ejemplo, el bucle b4 de la hélice (por ejemplo, entre los aminoácidos 430 y 433 de la L1 del VPH16). De acuerdo con la invención, el péptido de L2 se inserta en el bucle DE (por ejemplo, entre los aminoácidos 133/134 del BPV o los aminoácidos equivalentes 136/137 del VPH, lo que se ejemplifica en el presente documento. También se pueden usar los sitios de inserción equivalente de otros PV.

En una realización, el péptido se extiende desde los aminoácidos 17-36 de la L2 del VPH16, y tiene la secuencia QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV (SEQ ID NO:9). Un experto en la técnica reconocerá que esta secuencia está altamente conservada entre una variedad de cepas de PV.

En ciertas realizaciones, el péptido de L2 es un epítomo del VPH16 (SEQ ID NO:9). En aspectos adicionales, el péptido de L2 comprende los aminoácidos 17-36 de la SEQ ID NO:81 (17-36 de la L2 del VPH16 (SEQ ID NO:9)). Aunque este fragmento se denomina 17-36 basándose en el VPH16, la posición real de los aminoácidos de otros tipos de VPH puede diferir pero se identifican fácilmente mediante alineación con las secuencias del VPH16 desveladas en el presente documento (secuencias "equivalentes" o "comparables").

Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" es una molécula capaz de unirse a un anticuerpo o receptor de linfocitos T. Un antígeno es adicionalmente capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular que lleva a la estimulación de linfocitos B y/o de linfocitos T. El aspecto estructural de un antígeno que genera una respuesta biológica se refiere en el presente documento como "determinante antigénico" o "epítomo" y son sinónimos. Los linfocitos B responden a los determinantes antigénicos extraños mediante la producción de anticuerpos, mientras que los linfocitos T son los mediadores de una inmunidad celular. Por lo tanto, los determinantes antigénicos o epítomos son aquellas partes de un antígeno que son reconocidas por los anticuerpos, o en el ámbito de un MHC, mediante receptores de linfocitos T. Un determinante antigénico o epítomo no necesita ser una secuencia o segmento contiguo/consecutivo de la proteína y puede incluir diversas secuencias que no están inmediatamente adyacentes entre sí.

Con respecto a una secuencia particular de aminoácidos, un "epítomo" es un conjunto de restos de aminoácidos que está implicado en el reconocimiento mediante una inmunoglobulina particular, o en el ámbito de los linfocitos T, aquellos restos necesarios para el reconocimiento mediante proteínas del receptor de linfocitos T y/o de receptores del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los restos de aminoácidos de un epítomo no necesitan ser contiguos/consecutivos. En el contexto de un sistema inmunitario, *in vivo* o *in vitro*, un epítomo son las características colectivas de una molécula, tales como la estructura primaria, secundaria y terciaria del péptido, y la carga, que juntos forman un sitio reconocido por una inmunoglobulina, receptor de linfocitos T o molécula de HLA. A lo largo de la presente divulgación, "epítomo" y "péptido" se usan a menudo de manera intercambiable.

Tal como se usa en el presente documento, "epítomo de linfocitos B" o "epítomo diana" (por ejemplo, L2 del VPH) se refiere a una característica de un péptido o proteína que es reconocido por un receptor de linfocitos B en la respuesta inmunogénica para el péptido que comprende tal antígeno (por ejemplo, un epítomo de L2 del VPH (inmunógeno o epítomo diana)).

Tal como se usa en el presente documento "epítomo de linfocito T colaborador" o "epítomo de Th" significa una característica de un péptido o proteína que es reconocida por un receptor de linfocitos T al comienzo de una respuesta inmunológica para el péptido que comprende ese antígeno. Generalmente se cree que el reconocimiento

de un epítipo de linfocito T por un linfocito T es a través de un mecanismo en el que los linfocitos T reconocen fragmentos péptídicos de antígenos que están unidos a moléculas compleja principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o de clase II expresadas sobre células presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones de la presente invención, los epítopos o fragmentos epitópicos identificados tal como se describen en el presente documento encuentran su uso en la detección de células presentadoras de antígeno que tienen moléculas del MHC capaces de unirse y presentar los epítopos o fragmentos.

Tal como se usa en el presente documento, "VPH" y "papilomavirus humano" se refieren a los miembros de la familia papilomavirus que son capaces de infectar seres humanos. Existen dos grupos principales de VPH definidos por su tropismo (grupos genital/mucosal y cutáneo), cada uno de los cuales contiene múltiples "tipos" o "cepas" víricas (por ejemplo, VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 32, etc.). De interés particular en la presente invención son los tipos de VPH que están asociados con la infección genital y con la neoplasia maligna, así como los que producen papilomas benignos, tanto en la mucosa como en la piel, que dan como resultado la morbilidad para el paciente.

El término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene 1, 2, 3, 4, 5 o más composiciones de VLP de la presente invención. Las composiciones de VLP típicamente estarán en una forma que es capaz de administrarse a un sujeto e induce una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica suficiente como para inducir inmunidad para prevenir y/o mejorar una infección y/o para reducir al menos un síntoma de una infección y/o mejorar la eficacia de otra terapia anti-VPH o profiláctico. Típicamente, una vacuna comprende una solución salina convencional o medio de solución acuosa tamponada en el que la composición de la presente invención está suspendida o disuelta, aunque la administración de polvo seco, por ejemplo, mediante inhalación, e incluso la formulación con un adyuvante adicional, tal como alumbre, también se contempla. La composición de la presente invención se puede usar de manera conveniente para prevenir, mejorar o tratar de otro modo una infección. Tras la introducción en un hospedador, una composición inmunogénica de la invención (por ejemplo, una vacuna) es capaz de provocar una respuesta inmunitaria que incluye, pero sin limitación, la producción de anticuerpos y/o citocinas y/o la activación de linfocitos T citotóxicos, células presentadoras de antígeno, los linfocitos T colaboradores, células dendríticas y/o otras respuestas celulares. Típicamente, tal respuesta será de reacción cruzada entre diversos tipos de papilomavirus, incluyendo, pero sin limitarse a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de los tipos de VPH descritos en el presente documento. Los tipos particulares de VPH de reacción cruzada se tratan en alguna parte del presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, las vacunas, anticuerpos o sueros inmunológicos "profiláctico" y "preventivo" son vacunas, anticuerpos o sueros inmunológicos que se diseñan y administran para evitar la infección, enfermedad y/o cualquier secuela(s) provocada(s) por o asociada(s) a un organismo patógeno, en particular, VPH.

Tal como se usa en el presente documento, vacunas "terapéuticas" son vacunas que se diseñan y administran a los pacientes ya infectados por un organismo patógeno tal como al menos una cepa de VPH. Las vacunas terapéuticas (por ejemplo, vacunas terapéuticas del VPH) se usan para prevenir y/o tratar el desarrollo de tumores benignos o malignos en estos individuos infectados.

Los términos "inhibición", "reducción", o "prevención", o cualquier variación de esos términos, cuando se usa en la reivindicaciones y/o la memoria descriptiva incluye cualquier descenso medible o inhibición completa para lograr un resultado deseado, tal como inhibición, reducción o prevención de infección vírica, difusión vírica, crecimiento vírico, o transmisión vírica.

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o procedimiento que se está empleando para determinar el valor.

Se contempla que uno o más miembros de una lista proporcionada en el presente documento se puede, de manera específica, excluir de o incluir en una invención reivindicada.

Un "sujeto", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que se ha infectado por, o que está en riesgo de infectarse por, un papilomavirus. Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo, cobaya o cerdo), animales de granja (tales como ganado vacuno), animales deportivos (tales como perros o caballos) y animales domésticos o mascotas (tales como un caballo, un perro o un gato). Se incluyen los primates no humanos y los pacientes humanos.

Los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido", tal como se usa en el presente documento, no se restringen a ningún número particular de aminoácidos; estos términos se usan a veces de manera intercambiable en el presente documento. Las propiedades y las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la invención, y de los ácidos nucleicos que las codifican, son bien conocidas y se pueden determinar de manera rutinaria, así como descargar desde diversas bases de datos conocidas. Véase, por ejemplo, las bases de datos de NCBI GenBank. Algunas secuencias se proporcionan en el presente documento. Esta información es precisa a partir de la fecha de presentación de la presente solicitud. Sin embargo, alguna información de secuencia se actualiza de manera rutinaria (por ejemplo, para corregir errores en entradas anteriores), de manera que la información actualizada (corregida) sobre las proteínas y los ácidos nucleicos que las codifican se incluye en la presente solicitud. La información proporcionada en las bases de datos de secuencias tratadas en el presente documento se incorpora a

modo de referencia en la presente solicitud.

Las proteínas quiméricas tratadas en el presente documento se denominan a veces en el presente documento como "proteínas de la invención".

5 Un aspecto de la invención es un procedimiento para preparar una VLP (o el componente polipeptídico del mismo) de la invención. En una realización de la invención, los epitopos del VPH se sintetizan usando procedimientos convencionales como modificados para las secuencias de aminoácidos particulares. Tales técnicas incluyen, por ejemplo, procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica de síntesis de péptidos, por ejemplo, la síntesis en fase de solución [véase Finn y col. en *Proteins*, 3ª Ed., Neurath y Hill (Eds), Academic Press, NY, 2, 105-253, 1976], o la síntesis en fase sólida [véase Barany y col. en: *The Peptides*, Gross y Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 3-284, 1979], o la síntesis gradual en fase sólida tal como se comunica por Merrifield y col. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154].

15 Otras referencias a las técnicas de síntesis de péptidos incluyen péptidos sintetizados por el modo Fmoc-poliámidas de la síntesis de péptidos en fase sólida tal como se desvela en Lu y col. (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433, los péptidos sintetizados usando un procedimiento de Fmoc/tBu (Atherton y col. En: *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989). Los aminoácidos de Fmoc se pueden obtener de diversos proveedores, por ejemplo, Chem-Impex International (Wood Dale, Ill., EE.UU.), Merck Biosciences (Nottingham, Reino Unido) y Bachem UK Ltd. (St. Helens, Reino Unido).

20 Como alternativa, un polipéptido de la invención se puede preparar de manera recombinante. La presente invención proporciona vectores recombinantes de clonación y de expresión que contienen ADN, así como células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes. Los vectores de expresión que comprenden ADN se pueden usar para preparar los polipéptidos o los fragmentos de polipéptidos de la invención codificados por un ADN. Un procedimiento para producir polipéptidos comprende cultivar células hospedadoras transformadas con un vector de expresión recombinante que codifica el polipéptido, en condiciones que promueven la expresión del polipéptido, recuperando después los polipéptidos expresados del cultivo. El experto en la materia reconocerá que el procedimiento para purificar los polipéptidos expresados variará de acuerdo con tales factores como el tipo de células hospedadoras empleado, y si el polipéptido es de unión a membrana o una forma soluble que se secreta a partir de la célula hospedadora. Los polipéptidos de la invención pueden incluir diversas secuencias líder que dirigen el tráfico o ayudan en la purificación.

30 Se puede emplear cualquier sistema de expresión adecuado. Los vectores incluyen un ADN que codifica un polipéptido o fragmento de la invención, unido de manera operativa a secuencias de nucleótidos reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como las derivadas de un gen de mamífero, microbiano, vírico o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, operadores o potenciadores transcripcionales, un sitio de unión de ARNm ribosómico, y secuencias apropiadas que controlan la iniciación y la terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos están unidas de manera operativa cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de ADN. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida de manera operativa a una secuencia de ADN si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia de ADN. Un origen de replicación que confiere la capacidad de replicarse en las células hospedadoras deseadas, y un gen de selección mediante el cual se identifican los transformantes, se incorporan de manera general en el vector de expresión.

40 Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las células de mamífero o de insecto son generalmente preferidas para su uso como células hospedadoras. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero se describen, por ejemplo, en Pouwels y col. En: *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, NY, 1985. Los sistemas de traducción sin células también se podrían emplear para producir polipéptidos usando ARN que derivan de construcciones de ADN desveladas en el presente documento. En general, los procedimientos de biología molecular referidos en el presente documento son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, edición actual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY.

50 Los procedimientos para permitir que los polipéptidos se ensamblen en VLP son bien conocidos y convencionales, como lo son los procedimientos para purificarlos para su uso en sujetos. Para las "condiciones adecuadas para el autoensamblaje", véase, por ejemplo, los procedimientos descritos en los Ejemplos en el presente documento, o en Kirnbauer y col. (1993) *J Virol* 67, 6929-6936; Volpers y col. (1994) *Virology* 200, 504-512; o *J Mol Biol* 16 de marzo de 2001;307(1):173-82.

55 Los procedimientos de la presente invención incluyen la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o afección provocada por o relacionada con la infección por papilomavirus (por ejemplo, infección por VPH). Un péptido inmunogénico del VPH y/o un anticuerpo que se une al mismo, se puede dar para inducir o proporcionar una respuesta protectora y/o terapéutica en un sujeto infectado por o del que se supone que se ha expuesto a o en riesgo de llegar a estar infectado por el VPH. Los procedimientos se pueden emplear con respecto a los individuos

que han resultado positivos a la exposición al VPH o que se considera que están en riesgo de infección basándose en una posible exposición.

5 En algunas realizaciones, el tratamiento se administra en presencia de adyuvantes o vehículos y otros antígenos, bien antígenos del VPH u antígenos de otros patógenos. Por otro lado, en algunos ejemplos, el tratamiento comprende la administración de otros agentes usados de manera común frente a la infección vírica, tales como uno o más antiviricos.

10 La inmunogenicidad de las composiciones de VLP se pueden potenciar mediante el uso de estimuladores adicionales no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimuladores aceptables, tales como citocinas, toxinas o composiciones sintéticas tales como alumbre.

15 Se puede usar una serie de adyuvantes para potenciar una respuesta de anticuerpos frente a una VLP descrita en el presente documento. Los adyuvantes se pueden usar para (1) atrapar el antígeno en el cuerpo para provocar una liberación lenta; (2) atraer a células implicadas en la respuesta inmunitaria al sitio de administración; (3) inducir la proliferación o la activación de células del sistema inmunitario; o (4) mejorar la difusión del antígeno en todo el cuerpo del sujeto.

20 Los adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, sales minerales, polinucleótidos, y sustancias naturales. Los adyuvantes específicos que se pueden usar incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -interferón, GM-CSF, BCG, sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio u otro compuesto de aluminio, compuestos de MDP, tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y monofosforil lípido A (MPL) o agentes microbianos inactivos. RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura de pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2 %. Se pueden usar incluso antígenos de MHC. Otros adyuvantes o procedimientos se ejemplifican en las Patentes de EE.UU. 6.814.971, 5.084.269, 6.656.462.

25 Los diversos procedimientos para lograr el efecto adyuvante para la vacuna incluyen el uso de agentes tales como hidróxido de aluminio o fosfato (alumbre), usado de manera común como una solución de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato, mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (CARBOPOL®) usada como una solución de aproximadamente el 0,25 %, agregación de una proteína en la vacuna mediante tratamiento por calor con temperaturas que varían entre aproximadamente 70 ° a aproximadamente 101 °C durante un período de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. La agregación mediante reactivación con anticuerpos (Fab) tratados con pepsina a la albúmina; la mezcla con células bacterianas (por ejemplo, *C. parvum*), endotoxinas o componentes de lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas; la emulsión en vehículos de aceite fisiológicamente aceptables (por ejemplo, monooleato de manida (Aracel A)); o emulsión con una solución del 20 % de un perfluorocarbono (FLUOSOL-DA®) usado como un sustituto del bloque también se pueden emplea para producir un efecto adyuvante. Un adyuvante típico es el adyuvante completo de Freund (que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muertas), los adyuvantes incompletos de Freund e hidróxido de aluminio.

35 Para la administración a seres humanos, serán evidentes una variedad de adyuvantes adecuados para un trabajador experto. Entre estos se incluyen, por ejemplo, Alum-MPL como adyuvante, o la formulación comparable, ASO4, que se usa en la vacuna aprobada de la L1 del VPH Cervarix®, AS03, AS02, MF59, montanide, adyuvantes basados en saponina tales como GPI-0100, adyuvantes basados en CpG o imiquimod. En realizaciones de la invención, un adyuvante se acopla físicamente a la VLP, o se encapsula por la VLP, en lugar de mezclarse simplemente con ellas.

45 Además de adyuvantes, puede ser deseable coadministrar modificadores de respuesta biológica (BRM, del inglés *biologic response modifiers*) para mejorar las respuestas inmunitarias. Los BRM han demostrado que regulan positivamente la inmunidad de los linfocitos T o que regulan negativamente la actividad de células supresoras. Tales BRM incluyen, aunque sin limitación, Cimetidine (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); o ciclofosfamida de baja dosis (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ) y citocinas tales como γ -interferón, IL-2 o IL-12 o genes que codifican proteínas implicadas en funciones inmunitarias de los linfocitos T colaboradores, tales como B-7. En realizaciones de la invención, estos genes están encapsulados por la VLP para facilitar su suministro en un sujeto.

50 La forma de aplicación puede variar ampliamente. Cualquiera de los procedimientos convencionales de administración de una vacuna son aplicables. Se cree que estos incluyen la aplicación oral sobre una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral mediante inyección, inhalación de un polvo, mediante un parche transcutáneo, mediante instilación vaginal y similares. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con el tamaño y la salud del sujeto.

55 La preparación de vacunas que contienen polipéptido o secuencia(s) de péptidos como principios activos generalmente se entienden bien en la materia, tal como se ejemplifica mediante las Patentes de Estados Unidos 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770. Típicamente, tales vacunas se preparan como inyectables bien como soluciones líquidas o como suspensiones: las formas sólidas adecuadas para la solución en o la suspensión en líquido antes de la inyección también se pueden preparar. La preparación también puede emulsionarse. El principio activo inmunogénico se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente

aceptables y compatibles con el principio activo. Tales excipientes son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH o adyuvantes que potencian la eficacia de las vacunas. En realizaciones específicas, las vacunas se formulan con una combinación de sustancias, tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos 6.793.923 y 6.733.754.

Las vacunas se pueden administrar mediante inhalación. En determinadas realizaciones se puede administrar una vacuna como un aerosol. Tal como se usa en el presente documento, el término "aerosol" o "composición aerosolizada" se refiere a una suspensión de partículas sólidas o líquidas en un gas. Los términos se pueden usar de manera general para referirse a una composición que se ha vaporizado, nebulizado o convertido de otra manera desde una forma sólida o líquida a una forma inhalable que incluye partículas sólidas o líquidas de fármaco en suspensión. Tales aerosoles se pueden usar para suministrar una vacuna a través del sistema respiratorio. Tal como se usa en el presente documento, "sistema respiratorio" se refiere al sistema de órganos en el cuerpo responsable de la toma de oxígeno y la exhalación de dióxido de carbono. El sistema generalmente incluye todos los conductos de aire desde la nariz hasta los alveolos pulmonares. En mamíferos se considera de manera general que incluye los pulmones, los bronquios, los bronquiolos, la tráquea, los conductos nasales y el diafragma. Para los fines de la presente divulgación, el suministro de una vacuna al sistema respiratorio indica que un fármaco se suministra a uno o más de los conductos de aire del sistema respiratorio, en particular a los pulmones.

Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios (para aplicación anal o vaginal) y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialcalenglicoles o triglicéridos: tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 %, preferentemente desde el 1 % a aproximadamente el 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, las formulaciones de liberación sostenida o los polvos que contienen de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 95 % de principio activo, preferentemente desde el 25 % a aproximadamente el 70 %.

Las composiciones de VLP se pueden formular en una vacuna como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y aquellos que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o de hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

En muchos casos, será deseable tener múltiples administraciones de la vacuna, por lo general a lo sumo, al menos, o sin exceder 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más vacunas que incluyen todos los intervalos entre ellos. Las vacunas normalmente estarán a 1, 2, 3, 4, 5, 6, a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, a 12 semanas/mes/año de intervalo, incluyendo todos los valores y rangos entre ellos, más normalmente a partir de intervalos de tres a cinco semanas. Típicamente, los refuerzos periódicos a intervalos de 1-15 años, normalmente diez años, serán deseables para mantener niveles protectores de los anticuerpos. El trascurso de la inmunización puede ir seguido de ensayos para anticuerpos frente a los antígenos, tal como se describe en las anteriormente citadas, Patentes de Estados Unidos 3.791.932; 4.174.384 y 3.949.064, que son ilustrativas de estos tipos de ensayos.

Las composiciones y los procedimientos relacionados de la presente invención, particularmente la administración de una VLP que comprende un epítipo de L2 del VPH a un paciente/sujeto, también se pueden usar en combinación con la administración de la selección del VPH tradicional y/o otras vacunas, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, frotis de Pap, PCR, análisis por transferencia de Southern, administración de CERVARIX™, CERVARIX™, vacunas para el VPH u otros agentes infecciosos, terapia ablativa de lesiones del VPH, terapias inmunomoduladoras para las lesiones del VPH (por ejemplo, Aldara™) o similares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Los diferentes aspectos de la presente invención implican la administración de una cantidad eficaz de una composición a un sujeto. En algunas realizaciones de la presente invención, una VLP que comprende un epítipo de L2 del VPH se administra al paciente para proteger frente a o tratar la infección por uno o más patógenos del VPH. Tales composiciones generalmente se disolverán o se dispersarán en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del ámbito del buen criterio médico, adecuadas para poner en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problema acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", significa un material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, tal como un líquido o una carga sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar un agente químico. El vehículo

farmacéuticamente aceptable incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con los principios activos, se contempla su uso en composiciones inmunogénicas y terapéuticas.

Los compuestos activos de la presente invención se pueden formular para la administración parenteral, por ejemplo, formulado para la inyección mediante las vías intravenosas, intramusculares, subcutánea o incluso intraperitoneal. Además de los compuestos formulados para la administración en aerosol o parenteral, tal como aquellos para la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para la administración oral; cápsulas de liberación temporal.

Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete, o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que pueda inyectarse fácilmente. También debería ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y tiene que conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las composiciones de VLP se pueden formular en una forma neutra o sal. Las sales farmacológicamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o de hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede provocar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorbutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos ingredientes como se ha enumerado anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y secado en frío, que producen un polvo del principio activo, mas cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución de la misma previamente esterilizada por filtración.

La administración de las composiciones de acuerdo con la presente invención será típicamente mediante cualquier vía común. Esto incluye, pero no se limita a la administración oral, nasal o bucal. Como alternativa, la administración puede ser mediante administración ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, respiratoria o intravenosa. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna se puede inhalar (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.651.655). Tales composiciones normalmente se administrarían como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen vehículos fisiológicamente aceptables, tampones u otros excipientes.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería estar tamponada de manera adecuada, si fuera necesario, y el diluyente líquido en primer lugar se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en solución de NaCl isotónica y bien añadirse a fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences, de Remington, 1990). Algunas variaciones en la dosificación necesariamente tendrán lugar dependiendo de la afección del sujeto. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

Una cantidad eficaz de composición terapéutica o profiláctica se determina basándose en el objetivo deseado. Una "cantidad eficaz" es una cantidad que es eficaz para lograr un resultado deseado (por ejemplo, la inducción de una cantidad medible de una respuesta inmunitaria, la inmunización de un sujeto, etc.). La expresión "dosis unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para su uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas tratadas anteriormente en asociación con su administración, es decir, la vía y el régimen apropiados. La cantidad a administrar, tanto de acuerdo con la serie de tratamientos y la dosis unitaria, depende de la protección deseada.

Las cantidades precisas de la composición también dependen del juicio del practicante y son peculiares para cada individuo. Los factores que afectan a la dosis incluyen el estado físico y clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo deseado del tratamiento (mejora de los síntomas frente a cura), y la potencia, estabilidad y toxicidad de la composición particular.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

En una realización desvelada, las VLP se administran a los sujetos mediante la administración de una cantidad eficaz de una bacteria recombinante atenuada (tal como una bacteria de salmonela) que codifica un polipéptido quimérico de la invención. Las VLP se producen entonces *in vivo* por el intestino, en donde se replica la bacteria. Como guía para llevar a cabo procedimientos que usan tales vectores bacterianos, véase, por ejemplo, Nardelli-Haefliger (2007) Clin Vaccin Immunol 14, 1285-1295. Los procedimientos para generar construcciones recombinantes que se pueden expresar en bacterias (vectores bacterianos) son convencionales; algunos procedimientos típicos se describen en alguna parte en el presente documento. Las bacterias liofilizadas se pueden enviar fácilmente a los países en desarrollo, en donde se pueden resuspender después y administrarse a los sujetos. Tal modo de administración es ventajoso en un país que carece de capacidades de refrigeración que podrían requerirse para otras formulaciones de VLP. En otra realización, las VLP se administran en un virus atenuado, tal como un adenovirus atenuado u otros vectores víricos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos para producir ácidos nucleicos recombinantes adecuados que se puedan expresar en un hospedador vírico son convencionales, y algunos de tales procedimientos se tratan en alguna parte del presente documento.

La presente invención incluye composiciones para la prevención o la mejora de las infecciones por VPH. Como tal, la invención contempla vacunas para su uso tanto en realizaciones de inmunización activa y pasiva.

Los inóculos para la producción de anticuerpos policlonales se preparan típicamente mediante la dispersión de la composición antigénica en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como solución salina u otros adyuvantes adecuados para el uso humano para formar una composición acuosa. Una cantidad inmunestimuladora de inóculo se administra a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, y el sujeto inoculado se mantiene entonces durante un tiempo suficiente para la composición antigénica para inducir anticuerpos protectores. Los anticuerpos se pueden aislar en la medida deseada mediante técnicas bien conocidas tales como cromatografía de afinidad (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988)).

Los anticuerpos puede incluir preparaciones de antisuero de una variedad de animales comúnmente usados, por ejemplo, cabras, primates, burros, cerdos, caballos, cobayas, ratas o el ser humano. Los animales se sangran y se recupera el suero.

Una inmunoglobulina producida de acuerdo con la presente invención puede incluir anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o subfragmentos. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con doble especificidad para dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos, por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares que incluyen fragmentos híbridos. Una inmunoglobulina también puede incluir proteínas naturales, sintéticas o diseñadas genéticamente que actúan como un anticuerpo mediante la unión a antígenos específicos para formar un complejo.

Una composición de VPH o vacuna de la presente invención se puede administrar a un receptor que después actúa como una fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta a la exposición de la composición del VPH. Un sujeto, por tanto, tratado, donaría plasma del que se obtendría globulina hiperinmune mediante una metodología convencional de fraccionamiento de plasma. La globulina hiperinmune se administraría a otro sujeto con el fin de transmitir resistencia frente a o tratar la infección por VPH. Las globulinas hiperinmunes de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de la infección por VPH en lactantes, individuos inmunocomprometidos o cuando se requiere tratamiento y no hay tiempo para que el individuo produzca anticuerpos en respuesta a la vacuna.

Una divulgación adicional es una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos monoclonales (o fragmentos del mismo; preferentemente humanos o humanizados) reactivos frente a los constituyentes de la composición inmunogénica de la invención, que se podrían usar para tratar o prevenir la infección mediante múltiples

tipos de VPH.

Los procedimientos para preparar anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la materia y pueden incluir la fusión de esplenocitos con células de mieloma (Kohler y col. (1975) Nature 256, 495; Harlow y col. Antibodies: A Laboratory Manual, 1988). Como alternativa, los fragmentos Fv monoclonales se pueden obtener mediante la exploración de una biblioteca adecuada de expresión en fago (Vaughan y col. (1998) Nat Biotech 16, 535-539). Los anticuerpos monoclonales pueden ser humanos, humanizados o parcialmente humanizados mediante procedimientos conocidos.

Otro aspecto de la invención es un kit para vacunación o tratamiento de acuerdo con la presente invención. En una realización, el kit comprende un vial y, opcionalmente, un prospecto del envase con instrucciones de administración, el vial comprende una composición de VLP o una vacuna para la administración de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se pueden incluir en un kit. En un ejemplo no limitante, los reactivos para preparar una VLP y/o administrar una VLP, o anticuerpos generados mediante vacunación con VLP se pueden incluir en un kit. El kit puede incluir adicionalmente reactivos para evaluar la actividad de la VLP tanto *in vitro* como *in vivo*. Los kits, por tanto, comprenden, en un recipiente adecuado, una composición de VLP. En ciertos aspectos, el kit puede incluir reactivos y/o dispositivos para la administración, por ejemplo, inhalador o nebulizador. También puede incluir uno o más tampones, compuestos o dispositivos para preparar la composición para la administración.

Los componentes de los kits se pueden envasar en medios acuosos o en forma liofilizada. El medio contenedor de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio contenedor, en el que se puede colocar un componente, y preferentemente, adecuadamente alicuotado. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro recipiente adicional en el que se puedan colocar de forma separada los componentes adicionales. Sin embargo, diversas combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los recipientes en un confinamiento cerrado para su venta comercial. Tales recipientes pueden incluir la inyección o contenedores de plástico moldeados por soplado en los que se mantienen los viales deseados.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo una solución acuosa estéril particularmente preferida. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o los componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se pretende que el disolvente también se pueda proporcionar en otro recipiente.

Un kit también puede incluir instrucciones para el empleo de los componentes del kit así como para el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que se pueden implementar.

Se contempla que tales reactivos son realizaciones de kits de la invención. Tales kits, sin embargo, no se limitan a los artículos particulares identificados anteriormente, y pueden incluir cualquier reactivo usado para la preparación y/o la administración de una vacuna de VLP de la invención.

Entre otros usos, los kits de la invención se pueden usar en aplicaciones experimentales. Un trabajador experto reconocerá los componentes de los kits adecuados para llevar a cabo un procedimiento de la invención.

En lo anterior y en los siguientes ejemplos, todas las temperaturas se establecen en grados Celsius no corregidos; y, salvo que se indique de otra forma, todas las partes y porcentajes se dan en peso.

Ejemplos

Ejemplo I. Materiales y procedimientos

A. Expresión de Baculovirus de proteínas quiméricas L1-L2

Los péptidos de L2 del VPH16 se diseñaron genéticamente en bucles DE de superficie de la L1 del BPV1 (mediante inserción entre los aa 133 / 134) o la L1 del VPH16 (entre los aa 136 / 137). Los pares de cebadores usados en las construcciones son como sigue:

(1.) 5'- ctg ttt aca tgt ttt ata aag ggt gac ttt tct att cac att ttc tgc -3' (SEQ ID NO:58) (que codifica los aa 18-24 de la L2 del VPH16 / los aa 125-133 de la L1 del BPV)

50 5'- gca ggt aca tgt cca cct gac acc caa aca aca gat gac agg -3' (SEQ ID NO:59) (que codifica los aa 25-31 de la L2 del VPH16 / los aa 134-140 de la L1 del BPV)

(2.)

5'- ccg ctg aat tca ata tgg cgt tgt ggc aac aag -3' (SEQ ID NO:60) (que codifica EcoRI- aa 1-6 de la L1 del BPV)

5'- gca tga ggt acc get ttt att tct ttt tct ttg cag gc -3' (SEQ ID NO:61) (que codifica Kpn1- parada-aa 489-495 de

la L1 del BPV, timidinas [nt] 1476 y [nt] 1482 de la secuencia ORF de la L1 del BPV1 de tipo silvestre sustituidas por citosinas)

- (3.) 5'- gta taa tgt cag gtg gac atg tac ctg cct gtt tgc atg ttt tat aaa gtt ggg tga ctt ttc tat tca c -3' (SEQ ID NO:62) (que codifica los aa 17-33 de la L2 del VPH16 / los aa 128-133 de la L1 del BPV)
- 5 5'- cta agg tta ccc aaa caa cag atg aca gga aac aaa cag gcc -3' (SEQ ID NO:63) (que codifica los aa 34-36 de la L2 del VPH16 / los aa 134-145 de la L1 del BPV)
- (4.) 5' - cgg ccg cgg ggt gac ttt tct att c -3' (SEQ ID NO:64) (que codifica SstII - aa 129-133 de la L1 del BPV) 5' - cgg ccg cgg acc caa aca aca gat g -3' (SEQ ID NO:65) (que codifica SstII - aa 134 - 138 de la L1 del BPV)
- 10 (5.) 5'- ggc gac aca aac gtt ctg caa aac gca caa aac gtg cat cgg cta ccc aac ttt ata aaa cat gcc cgc -3' (SEQ ID NO:66) (que codifica los aa 2-22 de la L2 del VPH16 - SstII)
- 5'- ggg cat gtt tta taa agt tgg gta gcc gat gca cgt ttt gtg cgt ttt gca gaa cgt ttg tgt cgc cgc-3' (SEQ ID NO:67) (que codifica los aa 2-22 de la L2 del VPH16- SstII)
- (6.) 5'- gga agg ttg aag gca aaa cta ttg ctg atc aaa tat tac aat atg gaa gta tgg gtg tat ttt ttg gtg ggt tag gaa ttg gaa cag ggt cgg gta cag cgc gac gca ctg ggt ata ttc cat tgc cgc -3' (SEQ ID NO:68) (que codifica los aa 35-75 de la L2 del VPH16 - SstII) 5'- ggc aat gga ata tac cca gtg cgt ccg cct gta ccc gac cct gtt cca att cct aac cca cca aaa aat aca ccc ata ctt cca tat tgt aat att tga tca gca ata gtt ttg cct tca acc ttcc gc -3' (SEQ ID NO:69) (que codifica los aa 35-75 de la L2 del VPH16- SstII)
- 15 (7.) 5'- gca tga ccg cgg ttg gga aca agg cct ccc aca gct ac -3' (SEQ ID NO:70) (que codifica SstII- aa 75-83 de la L2 del VPH16) 5'-gca tga ccg cgg agt ttc ttc cac taa aga aac -3' (SEQ ID NO:71) (que codifica SstII- aa 106- 112 de la L2 del VPH16)
- 20 (8.) 5'- gca tga ccg cgg att gat gct ggt gca cca ac- 3' (SEQ ID NO:72) (que codifica SstII- aa 115-121 de la L2 del VPH16)
- 5'- gca tga ccg cgg agt agt aac agt att att aat atc -3' (SEQ ID NO:73) (que codifica SstII- aa 147-154 de la L2 del VPH16)
- 25 (9.) 5'- gca tga ccg cgg aat aat act gtt act act gtt act ac -3' (SEQ ID NO:74) (que codifica SstII- aa 149-156 de la L2 del VPH16) 5'- gca tga ccg cgg ttc tgc agg tgt tgg agg ctg caa tac -3' (SEQ ID NO:75) (que codifica SstII- aa 167-175 de la L2 del VPH16)
- (10.) 5'- gca tga ccg cgg cca aca cct gca gaa act gga g-3' (SEQ ID NO:76) (que codifica SstII- aa 172-178 de la L2 del VPH16) 5'- gca tga ccg cgg tgt atc cat agg aat ttc ttc ata att atg -3' (SEQ ID NO:77) (que codifica SstII-aa 191-200 de la L2 del VPH16)
- 30 (11.) 5'- gca tga ccg cgg gca tgc get acc caa ctt tat aaa ac-3' (SEQ ID NO:78) (que codifica SstII- aa 13-21 de la L2 del VPH16) 5'- gca tga ccg cgg aga aac tat aga agg atc aga agg gc-3' (SEQ ID NO:79) (que codifica SstII-aa 99-107 de la L2 del VPH16)

35 Las secuencias que codifican la L2 del VPH16 y la L1 del BPV, a partir de las cuales se generan estos cebadores, y las secuencias de las proteínas codificadas son:

ácido nucleico de la L2 del VPH16 (114) (SEQ ID NO:80)

ATGCGACACAAACGTTCTGCAAAAACGCACAAAACGTGCATCGGCTACCCAACCTTA
TAAAACATGCAAACAGGCAGGTACATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTGAAG
GCAAAACTATTGCTGATCAAATATTACAATATGGAAGTATGGGTGTATTTTTTGGTG
GGTTAGGAATTGGAACAGGGTCGGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCCATTG
GGAACAAGGCCTCCCACAGCTACAGATACACTTGCTCCTGTAAGACCCCTTTAAC
AGTAGATCCTGTGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTGGAAGAACTAG
TTTTATTGATGCTGGTGCACCAACATCTGTACCTTCCATTCCCCCAGATGTATCAGG
ATTTAGTATTACTACTTCAACTGATACCACACCTGCTATATTAGATATTAATAATAC
TGTTACTACTGTTACTACACATAATAATCCCACCTTTCCTGACCCATCTGTATTGCAG
CCTCCAACACCTGCAGAACTGGAGGGCATTTTACACTTTCATCATCCACTATTAGT
ACACATAATTATGAAGAAATTCCTATGGATACATTTATTGTTAGCACAAACCCTAAC
ACAGTAACTAGTAGCACACCCATAACCAGGGTCTCGCCCAGTGGCACGCCTAGGATT
ATATAGTCGCACAACACAACAAGTTAAAGTTGTAGACCCTGCTTTTGTAACCACTCC
CACTAAACTTATTACATATGATAATCCTGCATATGAAGGTATAGATGTGGATAATAC
ATTATATTTTTCTAGTAATGATAATAGTATTAATATAGCTCCAGATCCTGACTTTTTG
GATATAGTTGCTTTACATAGGCCAGCATTAACTCTAGGCGTACTGGCATAAGGTAC
AGTAGAATTGGTAATAAACAACACTACGTACTCGTAGTGGAATACTATAGGTGC
TAAGGTACATTATTATTATGATTTTAGTACCATTGATCCTGCAGAAGAAATAGAATT
ACAACTATAACACCTTCTACATATACTACCCTTACATGCAGCCTCACCTACTTC
TATTAATAATGGATTATATGATATTTATGCAGATGACTTTATTACAGATACTTCTAC
AACCCCGGTACCATCTGTACCCTCTACATCTTTATCAGGTTATATTCCTGCAAATAC
ACAATTCCTTTTGGTGGTGCATACAATATTCCTTTAGTATCAGGTCCTGATATACC
CATTAAATAACTGACCAAGCTCCTTCATTAATTCCTATAGTTCCAGGGTCTCCACA
ATATACAATTATTGCTGATGCAGGTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTA
CGAAAACGACGTAAACGTTTACCATATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCT

proteína L2 del VPH16 (114) (SEQ ID NO:81): (NC_001522)

MRHKRSKRTRKRASATQLYKTCKQAGTCPPDIIPKVEGKTIADQILQYGSMGVFFGGLG
IGTGSGTGGRTGYIPLGTRPPTATD'TLAPVRPPLTVDPVGPSDPSIVSLVEET'SFIDAGAPT
SVSPIPPDVSGFSITTS'DTTPAILDINNTV'TV'THNNPTFTDPSVLQPPTPAETGGHFTLS
SSTISTHNYEEIPMDTFIVSTNPNTVTSSTPIPGSRPVARLGLYSR'TTQVKVVDPAFV'TTP
TKLITYDNPAYEGIDVDNTLYFSSNDNSINIAPDPDFLDIVALHRPALTSRRTGIRYSRIGN
KQTLRTRSGKSIGAKVHYYYDFSTIDPAEEIELQ'TTTPSTY'TTTSHAASPTSINNGLYDIYA
DDFITD'TSTTPVPSVPSTSLSGYIPANTTIPFGGAYNIPLVSGPDIPINITDQAPSLIIVPGSP
QYTHIADAGDFYLHPSYYMLRKRRKRLPYFFSDVSLAA

ácido nucleico de la L1 del BPV1 (SEQ ID NO:82):

atggcgttgaggcaacaaggccagaagctgtatctccctccaaccctgtaagcaaggtgcttgcagtgaaacctatgtgcaagaaaa
gcatttttatcatgcagaaacggagcgcctgtaactataggacatccatattaccagtgctatcggggccaaaactgtcctaaggctct
gcaaatcagtatagggtatttaaaatacaactacctgatccaatcaattgcactacctgacaggactgttcacaacccaagtaaaagcgg
ctggtgtgggcagtcaggtgtgcaggtgtccagaggcagcctcttgaggactgtaactgggcaccccacttttaagtcttgat
gcagaaaatgtaatagaaaagtcaccacccaacaacagatgacaggaaacaacaggcctagatgtaagcaacaacagattctgtg
ctaggctgtaccctgctgaaggggaatattggacaacagcccgtccatgtgtactgatcgtctagaaaaatggcgctgcctcctctgaa
ttaaaaaaagcacatagaagatgggatgatgaaattgggttggtgcagccaactcaagaaataatgcaagtaaatcagatcta
cctctgacattcaaatgagatctgctgtaccagactacctcaaatgctgaggacgctgctgtaataagcatgtctttttgcaaggaa
agaacaggtgatgtagacacatctggaccagagggggctcgagaaagaagcccctaccacagattttttaaagaataataaagg
gatgccaccctaaaataaccagtgctcatttggtagcccagtggtcactagtctcaactgataatcaatttttaacggcctactggcta
ttccgtgccagggcagatgaacaatggaattgcatggaataattattgttttaacagtgggggacaatacacgtgtaacttaccataag
tgtagcctcagatggaaccccactaacagagatgatagctcaaaattcaatgtataccatagacatatggaagaatataagctagccttata
ttagagctatgctctgtgaaatcacagctcaactgtgacacatctgcaaggacttatgccctctgtgcttgaaaatgggaaataggtgtgc
agcctcctacctcatgatattagaggacacctatgctatagagctcctgcaactaaatgcaagcaatgtaattcctgcaaaagaaga
cccttatgcagggttaagtttgaacatagatcttaagaaaagcttcttggacttagatcaattcccttgggaagaagatttttagcacag
caaggggcaggtgttcaactgtgagaaaacgaagaattagccaaaaaacttccagtaagcctgcaaaaaaaaaaaaaaaaaataa

proteína L1 del BPV1 (SEQ ID NO:83):

MALWQQGQKLYLPPTPVSKVLCSETYVQRKSIFYHAETERLLTIGHPPYYPVSIGAKTVP
KVSANQYRVFKIQLPDPNQFALPDRTVHNPSKERLVWAVIGVQVSRGQPLGGTGTGHP
TFNALLDAENVNRKVTTQTDDRKQTGLDAKQQQILLGCTPAEGEYWTARPCVTDR
LENGACPPLELKNKHIEDGDMMEIGFGAANFKEINASKSDLPLDIQNEICLYPDYKMA
EDAAGNSMFFFFARKEQVYVRHIWTRGGSEKEAPTDFYLNKNGDATLKIPSVHFGSPS
GSLVSTDNQIFNRPYWLFRAQGMNNGIAWNNLLFLTVGDNTRGTNLTISVASDGTPLTE
YDSSKFNVYHRHMEEYKLAFILELCSVEITAQTVSHLQGLMPSVLENWEIGVQPPTSSIL
EDTYRYIESPATKASNVIPAKEDPYAGFKFWNIDLKEKLSLDLDQFPLGRRFLAQQGA
GCSTVRKRRISQKTSSKPAK KKKK

5 La secuencia que codifica la L1 del VPH16, que se usa en la construcción de la construcción J mostrada en la figura 1, y la secuencia de la proteína codificada, son:

ácido nucleico de la L1 del VPH16 (114K) (SEQ ID NO:84)

ATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTA

ES 2 653 251 T3

AGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCAGGA
ACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAATAAACCTAACAAAT
AACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACA
TTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACA
CAGCGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTTCGTGGTCAGCCATTAGGT
GTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAG
TGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACA
AACAAACACAATTGTGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGC
AAAGGATCCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGA
GTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTAT
GGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCTACTGGATATTTGTACATC
TATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTT
ATTTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGG
TACTGTTGGTGAAAATGTACCAGACGATTTATACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGC
AAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTTCCTACACCTAGTGGTTCATGGTTACCTCTGAT
GCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGG
CATTTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAA
TATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTT
TAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTG
CAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCCACTAT
TTTGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATA
CTTATAGGTTTGTAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCAC
CTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAG
TTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTTACTACAAGCAGGA
TTGAAGGCCAAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTC
ATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

proteína L1 del VPH16 (114K) (SEQ ID NO:85):

MSLWLPSEATVYLPVPVSKVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHHPYFPIKKNNNK
 ILVPKVSGLQYRVFRIHLDPNKFQFPDTSFYNPDTQRLVWACVGVGVGRGQPLGVGIS
 GHPLLNLKDDTENASAYAANAGVDNRECISMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPT
 NVAVNPGDCPPLELINTVIQDGMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYI
 KMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAAGTVGENVPDDLYIKGSGSTANLASSNYFPT
 PSGSMVTSDAQIFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMSLCAAISTSE
 TTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG

GTLEDTYRFVTSQAIAACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFL
 QAGLKAKPKFTLGRKATPTTSSTSTAKRKRKL

Los oligonucleótidos sintéticos orientados de manera inversa (de espaldas) (1., véase los pares de cebadores anteriormente) que codifican los aminoácidos 18-31 de la L2 del VPH16 se usaron para la inserción en el ORF de la L1 del BPV1 mediante una PCR inversa de touchdown, usando el vector de transferencia de baculovirus BPV1 L1-pEVmod (Kirnbauer y col. (1992) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89, 12180-12184). Para evitar productos no específicos, la temperatura de hibridación disminuyó en 1,5 °C durante siete ciclos, seguido por 30 ciclos adicionales a la temperatura final de touchdown. Posteriormente, las secuencias de L2 insertadas se unieron mediante ligadura de extremos romos. Las mutaciones silenciosas se introdujeron en el extremo C-terminal del ORF de la L1 (tramo poli-A) mediante (2.) para evitar mutaciones del amplímero. La secuencia L1-L2 mutada se volvió a clonar en el vector pEVmod y los epítomos de L2 insertados se alargaron adicionalmente mediante la replicación de la PCR (3.)

La siguiente serie de péptidos que abarca el extremo N-terminal de la L2 del VPH16 se incorporó en el BPV1 L1 pEVmod empleando un sitio de enzima de restricción (ccgcg) SstII recién establecido entre los aa 133 / 134 mediante PCR inversa de touchdown usando el par de cebadores (4.). Los oligonucleótidos de cadena doble (con sitios de SstII en los flancos) que codifican los péptidos de los aa 2-22 (5.), aa 35-75 (6.) de la L2 del VPH16 se generaron mediante hibridación de nucleótidos sintéticos, o mediante generación de amplímeros de PCR que codifican los aa 75-112 (7.), aa 115-154 (8.), aa 149-175 (9.), aa 172-200 (10.), aa 13-107 (11.) de la L2 del VPH16, respectivamente y se clonaron en el sitio de SstII de la L1 del BPV (aa 133 / 134). SstII (ccgcg) codifica para prolina (P) -arginina (R), añadida a ambos extremos de la L2 en las proteínas de fusión traducidas.

Un plásmido que codifica la L1 del VPH16 (que deriva del clon genómico 114K (27)) - aa 17-36 de la L2 del VPH16 (referido adicionalmente como 16L1-16L2 17-36) se generó mediante subclonación de los oligos sintéticos de codón optimizado (Geneart, Alemania) en los sitios BglII a KpnI del vector de transferencia de baculovirus pSynwtVI- (Kirnbauer y col. (1993) J Virol 67, 6929-36). Los vectores de expresión recombinante se verificaron mediante secuenciación bidireccional (VBC-Biotech; Viena, Austria).

Los baculovirus recombinantes se generaron mediante cotransfección de células de insecto Sf-9 con vectores de transferencia y ADN de baculovirus linealizado (BaculoGold, BD Biosciences). La expresión y purificación de las VLP se realizó tal como se describe anteriormente en Kirnbauer y col. (1992) (citado anteriormente). En resumen, las proteínas quiméricas se expresaron mediante infección de células de insecto con reservorios de baculovirus amplificado durante 3 días. Posteriormente, las células recolectadas se lisaron mediante ultrasonidos en PBS / NaCl 0,8 M / CaCl₂ 2 mM / PMSF 1 mM. Tras la adición de Brij58 al 0,5 %, las proteínas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las estructuras de elevada masa molecular se purificaron mediante ultracentrifugación en almohadillas de sacarosa / PBS (35 % p/v) y gradientes de densidad CsCl / PBS al 29 % (p/p) durante al menos 24 horas cada una.

El desensamblaje de la VLP en capsómeros pentaméricos se logró en condiciones reductoras mediante diálisis extensiva en TrisHCl 10 mM a pH 7,9 / DTT 10 mM / 2-mercaptoetanol (2-ME) al 7,5 % (adaptado por McCarthy y col. (1998) J Virol 72, 32-41). Las inmunizaciones se realizaron con pentámeros sometidos a rediálisis en tampón equivalente sin 2-ME. Para las inmunizaciones con antígeno desnaturalizado, la VLP se sometió a diálisis frente a PBS (NaCl 0,5 M / CaCl₂ 1 mM / Tween-80 0,02 %) y se hirvieron en SDS al 4 %.

B. Análisis por transferencias de Western

Las células Sf-9 se infectaron durante 3 días, se recolectaron, se desnaturalizaron en tampón de lisis (2-ME al 2 %) y se analizaron mediante SDS-Page y análisis por transferencia de Western. La expresión de proteínas L1 se verificó mediante anticuerpo monoclonal (mAb) AU1 que reconoce el epítipo lineal DTYRYI (BAbCO) de la L1 del BPV (SEQ ID NO:93), o Camvir-1 generado frente a la L1 del VPH16 (BD Pharmingen). Para verificar la antigenicidad de los péptidos de L2, las muestras se ensayaron con mAb RG-1 dirigidos a los aa 17-36 de la L2 del VPH16 (Gambhira y col. (2007b) J Virol 81, 13927-31), o suero policlonal de conejo generado frente a los aa 1-88 marcados con His de la L2 del VPH16 o los aa 11-200 marcados con His de la L2 del VPH16 (Pastrana y col. (2005a) Virology 337, 365-72).

C. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las partículas purificadas se cargaron sobre rejillas de cobre recubiertas de carbón con brillo descargado, se fijaron en glutaraldehído al 2,5 %, se tificaron de manera negativa con uranilacetato al 1 %, y se visualizaron con el microscopio electrónico JEOL 1010 a 80 kV y a 30.000 aumentos.

5 D. Inmunización

Las proteínas se sometieron a diálisis de manera extensiva frente a PBS que contiene NaCl 0,5 M / CaCl₂ 1 mM / Tween-80 al 0,02 %. Dos conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) se inmunizaron con cada 50 µg de partículas naturales o desnaturalizadas con SDS en adyuvante completo de Freund (CFA), seguido por tres refuerzos cuatro, seis y ocho semanas más tarde en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Charles River; Kisslegg, Alemania).
10 Como alternativa, los inmunógenos se administraron en una mezcla de 10:1 de gel de hidróxido de aluminio (A8222, Sigma-Aldrich) y monofosforil lípido A (S6322, Sigma-Aldrich) (citado como Alumbre-MPL) preparada de acuerdo con los protocolos del fabricante. A los ratones Balb/c se les dio 10 µg de antígeno y se reforzó cuatro, ocho y diez semanas después de la primera inyección. Los sueros se recolectaron 14 días después del último refuerzo y se almacenaron a -20 °C. E. ELISA

15 Los títulos de anticuerpos específicos generados contra los aa 2-22, 75-112, 115-154, 149-175, 172-200 de L1 del BPV1-L2 del VPH16 (denominado además como BL1-16L2) se determinaron mediante ELISA, usando los polipéptidos de aa 1-88 de la L2 marcados con His del VPH16 o los aa 11-200 de la L2 del VPH16 para recubrir las placas de microtítulo.

20 Estos antígenos se generaron usando el vector pET28A (Pastrana y col. (2005a) (citado anteriormente) transformado en *E. coli* de Rosetta DE3 (Novagen), se indujeron por IPTG y se purificaron por afinidad sobre columnas de Ni-NTA (Qiagen). Las proteínas eluidas se agruparon, se verificaron mediante análisis por transferencia de Western, se cuantificaron mediante el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce) y se almacenaron a -20 °C.

25 El ELISA se realizó tal como se describe anteriormente (Gambhira y col. (2007b) *J Virol* 81, 13927-31). Las placas Maxisorb (Nunc) se recubrieron toda la noche con 0,1 µg / pocillo de péptido de L2 en tampón de carbonato (a pH 9,6) y se bloquearon con BSA-PBS al 1 %. Las diluciones seriadas de diez veces de antisuero se incubaron por triplicado en pocillos en BSA / PBS / Tween-20 (Tw-20) al 0,05 %. Tras 3 lavados con PBS / Tween-20 al 0,05 %, el anticuerpo conjugado con peroxidasa en BSA / PBS / Tween-20 al 0,05 % (1:5000) se añadió y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron y se desarrollaron mediante adición del sustrato ABTS (Boehringer Mannheim). La densidad óptica (DO) a 405 nm se determinó usando un lector de ELISA
30 (Dynatech).

F. ELISA usando el péptido sintético biotinilado de los aa 18-31 de la L2 del VPH16

35 El antisuero generado frente a los aa 18-31 de BL1-16L2, los aa 17-36 de BL1-16L2, los aa 17-36 de 16L1-16L2 se examinaron mediante ELISA usando el péptido biotinilado de los aa 18-31 de la L2 del VPH16 (LYKTCKQAGTCPPD (SEQ ID NO:94); JPT Peptide Technologies; Berlín, Alemania) como antígeno (Slupetzky y col. (2007) *Vaccine* 25, 2001-10). Se añadió un µg de péptido / pocillo a las placas de estreptavidina Nunc durante toda la noche (tal como se especifica mediante el protocolo general de recubrimiento con estreptavidina Nunc). Las placas se lavaron con PBS, se bloquearon durante toda la noche con leche desnatada en polvo al 0,5 % / PBS a 4 °C, y se incubaron con antisuero diluido de forma seriada durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS, se añadió una dilución de 1:10.000 de conjugado, las placas se lavaron, se desarrollaron con ABTS y se determinaron con DO a
40 405 nm.

G. Ensayo de neutralización de pseudovirion

45 Los pseudoviriones se produjeron en células 293TT y se purificaron sobre gradientes Optiprep (Sigma) tal como se describe por Buck y col. (véase la página web mundial: ccr.cancer.gov/lco/protocols.asp) con pequeñas modificaciones. Se usaron los siguientes plásmidos para la expresión de las proteínas de la cápside L1 y L2 o fosfatasa alcalina secretada (SEAP):

50 Plásmidos de empaquetamiento: VPH5: p5sheLL; VPH6: p6sheLL; HPV16: p16L1h, p16L2h; VPH18: peL1fB, peL2bhb; VPH45: p45shell, CRPV: pCRPVL1, pCRPVL2 (proporcionado por J. Schiller, NIH, mapas de plásmido y referencias: véase la página web mundial home.ccr.cancer.gov/Lco/plasmids.asp), VPH31: p31L1h, p31L2h (Konda y col. (2007) *Virology* 358, 266-72); VPH52: p52L1h, p52L2h (no publicado)
VPH58: p58L1h, p58L2h (Konda y col. (2007) (citado anteriormente) (proporcionado por Kanda, Tokyo)
VPH11: L1 del VPH11, L2 del VPH11, L1/L2 del VPH11, no publicado (proporcionado por M. Müller, Heidelberg)
Plásmido diana: pYSEAP (proporcionado por J. Schiller, NIH)

55 Los vectores de expresión para empaquetar las proteínas de la cápside se cotransfectaron con el plásmido reportero pYSEAP y la generación de la cápside se detectó mediante colorimetría. Los ensayos de neutralización se realizaron de acuerdo con un protocolo adaptado (véase la página web mundial: ccr.cancer.gov/lco/neutralizationassay.htm). Los pseudoviriones se preincubaron con diluciones seriadas a 1:2 de suero, comenzando a 1:100 en pocillos

duplicados sobre hielo durante 1 hora. Tras la infección con soluciones de pseudovirión, las células 293TT se incubaron durante 72 horas a 37 °C y la actividad SEAP se determinó en sobrenadantes de células aclarados mediante colorimetría a 405 nm (ALph y col. (2008) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105, 5850-5). Los títulos de neutralización se comunicaron como los recíprocos de la dilución más alta que provoca una reducción al 50 % de la actividad de SEAP en cada ensayo, en comparación con el suero pre-inmunitario de la misma dilución. Cuando la reducción de SEAP es cercana al 50 % a una dilución de 1:100, los sueros se vuelven a evaluar a 1:50.

Ejemplo II. Resultados

Los estudios previos determinaron que la inmunización con los aa 1-88 del péptido L2 del VPH16 indujeron respuestas inmunes humorales de bajo título para el VPH16 homólogo y la neutralización cruzada de los tipos heterólogos *in vivo* (Pastrana y col. (2005a) (citado anteriormente) y que la vacunación con los aa 11-200 del péptido L2 del VPH16 confiere una protección cruzada *in vivo* frente a la exposición por CRPV y ROPV (Gambhira y col. (2007a) J Virol 81, 11585-92). Con el fin de potenciar los títulos de anticuerpos generados mediante inmunización, los péptidos de L2 se incorporaron en un sitio de exposición en superficie de L1, lo que resulta presumiblemente en una matriz de 360 veces de L2 sobre la superficie de la cápside.

Anteriormente, los péptidos de hasta 9 aa de longitud se han expresado de manera satisfactoria mediante el bucle DE sobre la superficie de la VLP del BPV1 sin comprometer la capacidad para ensamblarse en VLP inmunogénicas (Handisurya y col. (2007) FEBS J 274, 1747-1758; Slupetzky y col. (2007) (citado anteriormente)). Por lo tanto, el bucle DE de la L1 se eligió para la inserción para presentar el péptido de L2 en superficie de la VLP quimérica ensamblada del BPV1 (Fig. 1). El uso de cápsides del BPV1 como vehículos evita la inducción de antisuero neutralizante anti L1 del VPH que podría oscurecer la detección de los anticuerpos neutralizantes (neutralización cruzada) anti L2 del VPH16 de bajo título. Las secuencias codificantes para nueve péptidos de L2 del VPH16 parcialmente solapantes, los aa 18-31 (A), los aa 17-36 (B, que se corresponde con el epítipo del mAb RG-1); los aa 2-22 (C), los aa 35-75 (D), los aa 75-112 (E), los aa 115-154 (F), los aa 149-175 (G), los aa 172-200 (H), los aa 13-107 (I) se insertaron entre los codones 133 y 134 de la L1 del BPV1. También se generó un vector de expresión para una proteína de fusión L1-L2 quimérica adicional con inserción de los aa 17-36 de la L2 del VPH16 en la L1 del VPH16 (16L1-16L2 17-36) (J). Como el VPH16 es el más importante del tipo de alto riesgo que provoca el 50 % de los cánceres de cuello de útero en todo el mundo, los inventores razonaron que el uso de la VLP de la L1 del VPH16 como vehículo para la L2 del VPH16 permitiría la inducción de una respuesta inmunitaria combinada de anti-L1 del VPH16 de alto título y anti-L2 de amplia neutralización cruzada. En este caso, la inserción en el bucle DE de la L1 del VPH16 entre los codones 136 y 137 se eligió mediante alineación de secuencias.

Los baculovirus recombinantes se generaron y se usaron para la infección de células Sf-9 de insecto. Tres días después, las células se lisaron y se analizaron mediante SDS-PAGE. El análisis por transferencia de Western de las proteínas recombinantes con el mAb AU1 (anti-L1 del BPV) y Camvir-1 (anti-L1 del VPH16) mostraron la migración en un intervalo de 45-60 KD (Fig. 2a, A-J). Como era de esperar, la migración de la mayoría de las proteínas de fusión L1-L2 fue ligeramente más lenta en comparación con las proteínas L1 de tipo silvestre.

La antigenicidad de los péptidos de L2 del VPH16 insertados se verificó mediante el mAb RG-1 (anti-aa 17-36 de la L2 del VPH16) o suero policlonal de conejo generado contra los aa 1-88 de la L2 del VPH16 o los aa 11-200 de la L2 del VPH16 según sea apropiado (Fig. 2b). Varias bandas de migración más rápidas se generan probablemente por la degradación de la proteína.

La VLP natural de la L1 desencadena anticuerpos neutralizantes de título más alto que las subunidades pentaméricas, y los pentámeros son notablemente más inmunogénicos que la proteína monomérica L1 desnaturada. Por lo tanto, el estado de ensamblaje de las proteínas quiméricas L1-L2 se determinó mediante MET. En el caso de formaciones morfológicas ambiguas, el ensamblaje en capsómeros se distinguió adicionalmente mediante el ELISA realizado con el mAb 5B6 dependiente de la conformación, cuya unión depende del ensamblaje de la L1 del BPV1 en pentámeros (Slupetzky y col. (2001) J Gen Virol 82, 2799-804).

Tal y como se muestra en la Fig. 3, la MET demostró el ensamblaje en VLP de tamaño completo (aproximadamente 50-60 nm de diámetro) de 18-31 (A), 17-36 (B), 2-22 (C), 75-112 (E), 115-154 (F), 149-175 (G) y 172-200 (H) de BL1-16L2, y 17-36 (J) de 16L1-16L2. Las proteínas quiméricas 35-75 (D) de BL1-16L2 y 13-107 (I) de BI1-16L2 se dieron en conformaciones menos ordenadas, sugiriendo la presencia de pentámeros de L1 o agregados proteicos. Para distinguir adicionalmente estas posibilidades, se realizaron los ELISA usando el mAb 5B6 (38) y el mAb AU1. Ninguno de las preparaciones de proteína que carecen de VLP (D e I) reaccionaron con 5B6, sugiriendo que las proteínas quiméricas D e I fueron incapaces de ensamblarse en pentámeros. Por otra parte, los resultados demostraron la unión mejorada del mAb AU1 con la 13-107 (I) de BL1-16L2 desnaturada, en comparación con las preparaciones naturales, pero no para la 35-75 (D) de BL1-16L2, sugiriendo una formación parcial dependiente de la conformación de la proteína anterior (I) pero no la última proteína (D) (datos no mostrados). Por consiguiente, los investigadores se abstuvieron de la inmunización con la 35-75 de BL1-16L2.

En conjunto, ocho de diez proteínas quiméricas fueron capaces de ensamblarse en VLP, presentando hasta 44 aa de 16L2 (115-154 (F) de BL1-16L2, más cuatro aa codificados por los sitios SstII de enzima de restricción en los flancos) en el bucle de superficie DE de la L1 del nBPV1, y 20 aa en la L1 del VPH16 (J), respectivamente (Fig. 1, 3).

Anticuerpos séricos específicos de L2

- La inmunogenicidad de la VLP de la L1-L2 quimérica y las respuestas inmunes humorales para los péptidos de L2 presentados se determinaron mediante la inmunización de los conejos NZW. Cada antígeno se administró como partículas naturales o antígeno desnaturalizado por SDS, con el fin de determinar el impacto de la estructura de la partícula sobre la inmunogenicidad. Las inmunizaciones se realizaron usando el potente adyuvante de Freund (CFA/IFA). Los antígenos que indujeron amplias respuestas de anticuerpos de neutralización cruzada se administraron adicionalmente usando alumbre-MPL aplicable a seres humanos como adyuvante. Por otra parte, los ratones Balb/c de la misma estirpe se inocularon con formulaciones de antígeno-alumbre-MPL con el fin de abarcar un sistema de mamíferos alternativo.
- Se inmunizaron dos conejos NZW n CFA/IFA con 18-31 (A), 17-36 (B), 2-22 (C), 75-112 (E), 115-154 (F), 149-175 (G), 172-200 (H) de BL1-16L2, cada uno como preparaciones naturales o desnaturalizadas por SDS. Debido a su ensamblaje incompleto, la proteína 13-107 (I) de BL1-16L2 se inoculó solo como una preparación natural.
- Mediante ELISA, se detectaron las respuestas inmunitarias específicas de L2 usando el péptido sintético de los aa 18-31 de la L2 del VPH16, o los aa 1-88 de la L2 del VPH16 expresados en bacterias o las proteínas de los aa 11-200, respectivamente como antígenos (Tabla 2). Aparte de la 2-22 (C) de BL1-16L2, todas las preparaciones de VLP indujeron respuestas de anticuerpos significativas (con títulos que varían de 2.500-312.500), mientras que las correspondientes proteínas desnaturalizadas generaron cada una niveles de anticuerpo que fueron típicamente cinco veces más bajos (títulos de 500-12.500). Los sueros preinmunológicos no fueron reactivos en todos los casos.
- Estos resultados demuestran una inmunogenicidad mejorada de epítomos presentes en la VLP natural, en comparación con las proteínas desnaturalizadas análogas. La ausencia completa de una respuesta humoral detectable para L2 mediante inmunización con la 2-22 (C) de BL1-16L2 sugiere que los 20 aa del extremo N-terminal de la L2 del VPH16 no representa un epítomo de linfocitos B en conejos. Por otra parte, la incapacidad de la 13-107 (I) de BL1-16L2 para ensamblarse en VLP puede ser responsable de inducir solo una respuesta inmunitaria modesta anti-L2 (títulos de 500) (Tabla 2).

- Tabla 2
Evaluación de antisueros de conejo mediante ELISA del péptido L2 del VPH16. Dos conejos NZW se vacunaron cada uno con las proteínas quiméricas de BL1-16L2 indicadas, bien como VLP naturales o preparaciones interrumpidas con SDS, usando Freund (CFA/IFA) como adyuvante. El ELISA se realizó usando los aa 1-88 de la L2 del VPH16 (para sueros generados frente a 2-22 de BL1-16L2), los aa 18-31 de la L2 del VPH16 (18-31 de BL1-16L2, 17-36 de BL1-16L2), los aa 11-200 de la L2 del VPH16 (75-112 de BL1-16L2, 115-154 de BL1-16L2, 149-175 de BL1-16L2, 172-200 de BL1-16L2, 13-107 de BL1-16L2) como antígenos de ELISA. Los sueros se diluyeron en serie de punto final y se ensayaron en triplicados. La proteína 13-107 de BL1-16L2 interrumpida con SDS no se ha usado como inmunógeno (X).

antisueros de conejo	antisueros para BL1-16L2 (ELISA de L2)							
	18-31 (A)	17-36 (B)	2-22 (C)	75-112 (E)	115-154 (F)	149-175 (G)	172-200 (H)	13-107 (I)
proteína natural								
NZW n.º 1	62.500	62.500	0	2.500	62.500	62.500	312.500	500
NZW n.º 2	62.500	62.500	0	2.500	62.500	62.500	312.500	500
proteína desnat.								
NZW n.º 3	12.500	2.500	0	500	2.500	12.500	12.500	x
NZW n.º 4	12.500	100	0	500	2.500	2.500	12.500	x

Neutralización *in vitro*

- Los ensayos de neutralización de pseudovirión aprovechan los vectores de transferencia génica basados en papilomavirus (pseudoviriones) para imitar la infección por papilomavirus y su inhibición *in vitro* (Buck y col. (2005) *Methods Mol Med* 119, 445-62). La infección de cultivos celulares con cápsides de L1 / L2, que encapsulan el plásmido reportero pYSEAP, lleva a la expresión de fosfatasa alcalina secretada (SEAP), que se puede medir en el sobrenadante, mientras que la preincubación de pseudoviriones con anticuerpos neutralizantes evita la infección y disminuye la cantidad de SEAP. Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes se correlacionan con la protección de los animales de la exposición vírica *in vivo* (Alphs y col. (2008) (citado anteriormente); Gambhira y col. (2007b) (citado anteriormente)).
- Los ensayos de neutralización se realizaron con pseudoviriones del tipo VPH16 homólogo a L2 y del VPH18 de alto riesgo divergente a L2 (Tabla 3a). Los sueros incapaces de neutralizar la infección con cualquier tipo no se evaluaron adicionalmente. Todos los sueros se ensayaron en diluciones seriadas 10 veces de 1:100 - 1:100.000, la evidencia de niveles de anticuerpo menores se reevaluó para diluciones de suero de 1:50, mientras que los títulos < 50 se consideraron insignificantes.

Tabla 3a

Ensayos de neutralización de pseudovirión de sueros de conejo generados contra proteínas de BL-1-16L2 naturales o desnaturalizadas (desnat.) usando Freund (CFA/IFA) como adyuvante. Se muestran los títulos de cada uno de los dos animales. Los sueros que no neutralizaron ni el FIPV16 ni el FIPV18 no se ensayaron (X) para los tipos de pseudovirión restantes. Los ensayos se realizaron con diluciones de suero que varían desde 1:100 a 1:100.000. Cuando un título bajo de neutralización fue sospechoso, los sueros se reevaluaron a dilución de 1:50.

pseudoviriones	antisueros para BL-1-16L2 (títulos de neutralización)											
	18-31 (A) natural	18-31 (A) desnat.	17-36 (B) natural	17-36 (B) desnat.	75-112 (E) natural	75-112 (E) desnat.	115-154 (F) natural	115-154 (F) desnat.	115-154 (F) natural	115-154 (F) desnat.	13-107 (I) natural	13-107 (I) desnat.
VPH 16	0	100	1.000	100	100	50	1.000	100	0	100	0	100
VPH 18	100	100	10.000	100	0	0	100	0	0	50	0	0
	0	100	100-	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	100	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VPH 31	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	X	X	0	0	0	X	X	0
VPH 45	0	100	100	0	0	X	0	0	0	0	0	0
	0	0	100-	0	X	X	0	0	0	X	X	0
	0	0	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VPH 52	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
	0	100	100	0	0	X	0	0	0	X	X	0
VPH 58	0	0	100	100	0	X	0	0	0	0	0	50
	0	100	1.000	0	X	X	0	0	0	X	X	0
VPH	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
VPH 5	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
	0	1.000	50-100	100	0	X	0	0	0	0	0	0
	100	100	10.000	0	X	X	0	0	0	X	0	X
CRPV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	50	0	0	X	X	0	0	0	0	0	X
pseudoviriones	2-22 (C) natural	2-22 (C) desnat.	18-31 (A) pentámero	149-175 (G) natural	149-175 (G) desnat.	172-200 (H) natural	172-200 (H) desnat.	172-200 (H) natural	172-200 (H) desnat.			
VPH 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
VPH 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Tabla 3b

Neutralización de pseudoviriones del BPV1 mediante sueros generados contra VLP natural del BL1-16L2 quimérico. Los ensayos se realizaron con diluciones de suero de 1:100 a 1:100.000. El suero de conejo de la VLP de la L1/L2 del BPV se generó contra la L1 del BPV más la VLP de L2 coexpresadas.

pseudoviriones	18-31 (A) natural		17-36 (B) natural		2-22 (C) natural		75-112 (E) natural		115-154 (F) natural		149-175 (G) natural		172-200 (H) natural		BL1/L2 natural
	1.000.000	100.000	1.000.000	100.000	10.000	1.000.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	1.000.000	1.000.000	1.000	
BPV1	100.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000	10.000	1.000.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	1.000.000	1.000.000	10.000	100.000

- Tal como se esperaba de los resultados negativos del ELISA, el antisuero de 2-22 (C) de BL1-16L2 no contuvo ningún anticuerpo neutralizante detectable. Uno de dos conejos inmunizados con la VLP natural de la 18-31 (A) del BL1-16L2 desarrollaron antisueros neutralizantes para el VPH16 (título 1:100) y beta-VPH5 no relacionado (1:100). Por el contrario, el antígeno desnaturalizado con SDS indujo anticuerpos neutralizantes para aquellos y 4 tipos adicionales de VPH (los títulos de ambos animales se dan entre paréntesis) VPH16 (100 / 100), VPH18 (100 / 100), VPH45 (100 / 0), VPH52 (0 / 100), VPH58 (0 / 100), VPH5 (1.000 / 100) así como CRPV (0 / 50). Por lo tanto, se concluyó que la presentación del péptido 18-31 de la L2 del VPH16 en la VLP quimérica fue desventajosa para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Además, los animales inmunizados con los aa 18-31 (A) de BL1-16L2 desensamblado en capsómeros pentavalentes fueron incapaces de inducir anticuerpos neutralizantes (no mostrado).
- 5
- 10 La inmunización de conejos con la VLP de 17-36 (B) de BL1-16L2 (que comprende el epítipo RG-1) indujo anticuerpos neutralizantes frente a cinco tipos de VPH de alto riesgo, el VPH16 (1.000 / 10.000), el VPH18 (100-1.000 / 1.000), el VPH45 (100 / 100 -1.000), el VPH52 (0 / 100), el VPH58 (100 / 1.000), el VPH11 de tipo de bajo riesgo (0 / 50-100) y el beta-VPH de tipo 5 (100 / 10.000). Los sueros inmunológicos para la VLP interrumpida provocaron menos títulos diferentes para el VPH16 (100 / 100), el VPH18 (100 / 0), el VPH58 (100 / 0) y el VPH5 (100 / 0), y la neutralización no fue detectable para el VPH45, el VPH52 y el VPH11.
- 15
- La vacuna con las partículas quiméricas 75-112 (E) de BL1-16L2 y 115-154 (F) de BL1-16L2 neutralizaron pseudoviriones del VPH16 con títulos de (100 / 0) (E) y (1.000 / 100) (F) respectivamente, pero no neutralizaron de manera cruzada ninguno de los otros pseudoviriones ensayados. Los antígenos desnaturalizados correspondientes generaron títulos modestos de (50 / 0) (E) y (100 / 50) (F), respectivamente.
- 20
- Aunque las 149-175 (G) de BL1-16L2, 172-200 (H) de BL1-16L2 tanto nativas como desnaturalizadas indujeron respuestas inmunitarias específicas de 16L2 mediante ELISA, los antisueros fueron no neutralizantes para el VPH16 y el VPH18. Uno de los dos animales, inoculados con la proteína 13-107 (I) de BL1-16L2, desarrollaron anticuerpos neutralizantes frente al VPH16 (100 / 0) y el VPH58 (50 / 0) (Tabla 3a).
- 25
- Por lo tanto, los epítopos de neutralización se podrían mapear dentro de los aa 17-148 de la L2 del VPH16. Sin embargo, la inducción de la neutralización cruzada para los tipos genitales de alto riesgo (VPH52, VPH58), así como para los tipos de alto riesgo filogenéticamente divergentes (VPH18, VPH45), el genital de bajo riesgo (VPH11), el beta-VPH (VPH5) y el PV animal (CRPV) se restringió a los restos de aa 17-36 de la L2 del VPH16 (el epítipo RG-1) previamente documentados. La importancia de los aa 17 y 32-36 de los flancos se enfatiza mediante una neutralización insuficiente de los sueros generados contra la construcción 18-31. Por otra parte, la presentación sobre superficies de la VLP puede mejorar la inmunogenicidad de los epítopos expuestos en comparación con las proteínas lineales de fusión. Para determinar si la VLP quimérica mantuvo la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes para los epítopos dependientes de la conformación de la proteína transportadora L1, se realizaron ensayos de neutralización del pseudovirión BPV1 (Tabla 3b). Los antisueros inducidos por VLP quimérica (18-31 (A), 17-36 (B), 75-112 (E), 115-154 (F), 149-175 (G) de BL1-16L2) neutralizaron los pseudoviriones del BPV1 con títulos que varían desde 100.000 hasta 1.000.000, mientras que dos quimeras (2-22 (C) y 172-200 (H) de BL1-16L2) generaron títulos más bajos de anticuerpos neutralizantes (1.000 a 10.000). Por lo tanto, la inserción de cuatro de seis péptidos no interfirió con la inducción de anticuerpos neutralizantes de alto título frente a L1, independientemente del tamaño de los péptidos incorporados.
- 30
- 35
- 40 Dado que el adyuvante de Freund no está aprobado para el uso en seres humanos, se inmunizaron dos conejos adicionales con 17-36 (B) de BL1-16L2 usando alumbre-MPL como adyuvante. Se usó una formulación comparable (AS04) en la vacuna de la L1 del VPH aprobada Cervarix®. Además, se vacunaron cuatro ratones Balb/c con la misma formulación de antígeno-adyuvante para observaciones adicionales de neutralización cruzada para un sistema de mamífero diferente. El ELISA del péptido detectó respuestas de anticuerpos específicas de L2 con títulos de 2.500-12.500 tanto en conejos como en ratones (Fig. 4b, c). La VLP quimérica formulada sobre el adyuvante de Freund (Fig. 4a) indujo títulos de anticuerpo al menos cinco veces mayores en comparación con el alumbre-MPL.
- 45
- Tanto los conejos inmunizados con la formulación de alumbre-MPL generaron antisueros capaces de neutralizar el VPH16 de alto riesgo (100 / 100), el VPH18 (100 / 100) y el VPH58 (100 / 100) y el VPH5 de tipo beta (50 / 50) (Tabla 4a). Además, uno de los sueros de conejo neutralizó el VPH45 del tipo de alto riesgo (100) y el VPH6 de bajo riesgo (títulos de 50 a 100) y el VPH11 (100). Por lo tanto, con las pautas de inmunización similares a las del adyuvante de Freund, las inmunizaciones de VLP usando alumbre-MPL indujeron títulos que fueron uno o dos órdenes de magnitud más bajos. De los cuatro ratones inmunizados con 17-36 de BL1-16L2, un ratón desarrolló anticuerpos neutralizantes solo frente al VPH16 (título de 100), dos ratones generaron anticuerpos frente al VPH16 (1.000 / 50-100) y 18 (1.000 / 100) y un animal desarrolló anticuerpos frente al VPH18 (100), 31 (100), 45 (100), 52 (100) y 58 (100) (Tabla 4a).
- 50
- 55

Tabla 4

4a. Ensayos de neutralización de pseudovirión para antisueros de dos conejos NZW y cuatro ratones Balb/c inmunizados con 17-36 BL1-16L2 usando alumbre-MPL como adyuvante.
 3b. Ensayos de neutralización de pseudovirión de antisueros de dos conejos NZW generados contra la 17-36 de 16L1-16L2 usando alumbre-MPL como adyuvante. Todos los ensayos se realizaron por duplicado para cuatro diluciones seriadas de suero de 10 veces de 1:100-1:100.000. Cuando se sospechó de un título de neutralización más bajo, los sueros se reevaluaron a una dilución de 1:50.

pseudoviriones	a 17-36 de BL1-16L2; Alumbre-MPL (título de neutralización)		b 17-36 16L1-16L2; Alumbre-MPL (título de neutralización)
	NZW n.º 1 / 2	Balb /c n.º 1 / 2 / 3 / 4	NZW n.º 1 / 2
VPH 16	100/100	0 / 1.000 / 100 / 50-100	100.000 / 100.000
VPH 18	100 / 100	100 / 1.000 / 0 / 100	1.000 / 1.000
VPH 31	0 / 0	100 / 0 / 0 / 0	10.000 / 1.000
VPH 45	100 / 0	100 / 0 / 0 / 0	1.000 / 100
VPH 52	0 / 0	100 / 0 / 0 / 0	100 / 50
VPH 58	100 / 100	100 / 0 / 0 / 0	1.000 / 1.000
VPH 6	50-100 / 0	0 / 0 / 0 / 0	100 / 50
VPH 11	100 / 0	0 / 0 / 0 / 0	100 / 0
VPH 5	50 / 50	0 / 0 / 0 / 0	100 / 50
CRPV	0 / 0	0 / 0 / 0 / 0	0 / 0

5 Para desarrollar adicionalmente las cápsides del VPH como posibles vehículos de vacuna, los inventores incorporaron el epítipo de los aa 17-36 (RG-1) de la L2 del VPH16 de protección cruzada en la L1 del VPH16 (derivada de la variante 114K alemana del VPH16 (Kirnbauer y col. (1993) (anteriormente citado)). El análogo al sitio de inserción para la L1 del BPV1 entre los aa 133 / 134, para la inserción del VPH16 entre los aa 136 / 137 se usó. Estos aa se localizan dentro del bucle de superficie DE, adyacentes a un segmento inmunodominante hipervariable de la L1. El ensamblaje en la VLP se observó mediante MET (Fig.3J). Se vacunaron dos conejos NZW con la VLP natural con adyuvante de alumbre-MPL. Tal como se examinó mediante el ELISA del péptido, la inmunización indujo anticuerpos específicos de L2 en ambos animales con títulos de 1:12.500 (Fig.4d).

10 Cuando se analizó mediante ensayos de neutralización de pseudovirión, ambos sueros de conejo neutralizaron el VPH16 con títulos de 100.000, lo que refleja en gran medida la respuesta de anticuerpos al vehículo de VLP de la L1 del VPH16. Por otra parte, se observó la fuerte neutralización de los tipos de VPH18 heterotípicos de alto riesgo (1.000 / 1.000), VPH31 (10.000 / 1.000), VPH45 (1.000 / 100), VPH52 (100 / 50) y VPH58 (1.000 / 1.000). Además, se detectó la neutralización de los tipos de bajo riesgo del VPH6 (100 / 50), VPH11 (100) mediante uno de los sueros
 15 de conejo y del VPH5 de tipo beta (100 / 50) (Tabla 4b). Como era de esperar, el antisuero de conejo n.º 4835 (J.Schiller), producido frente a la VLP de la L1 del VPH16, con adyuvante de Freund neutralizó solo el VPH16 (1.000.000) y el VPH31 estrechamente relacionado (1.000) (datos no mostrados). Estos resultados eliminan el impacto del vehículo L1 en el amplio rango de neutralización cruzada e indican que la inserción de los péptidos de L2 no interfieren con las respuestas de anticuerpos de alto título frente a L1.

20 **Discusión**

El impacto de las vacunas de VLP de la L1 del VPH recientemente introducidas sobre la carga de las neoplasias ano-genitales asociadas al VPH y su eficacia de coste son el tema de los estudios actuales. Las vacunas actuales se dirigen a los tipos de VPH que provocan el 90 % de las verrugas ano-genitales (VPH6, VPH11) y/o el 70 % de los
 25 cánceres de cuello de útero (VPH16, VPH18). La protección mediante vacuna de la VLP de la L1 está principalmente restringido al tipo con protección cruzada parcial frente a algunos de tipo mucosal filogenéticamente relacionados. Por lo tanto, los programas de exámenes citológicos colectivos en mujeres vacunadas no se pueden abandonar, y los costes considerables para la introducción de programas de inmunización profiláctica en la población se deben asumir, además de los costes de los exámenes colectivos. Además, las vacunas actualmente disponibles son muy costosas en este momento para su uso en países en desarrollo, en donde tiene lugar el 80 % de la carga de cáncer
 30 de cuello de útero.

Los estudios previos han demostrado que la vacuna con péptidos o proteínas de L2 en N-terminal o de longitud completa pueden inducir una respuesta de anticuerpos de bajo título aún protectora para un amplio intervalo de tipos y especies divergentes de papilomavirus. La estrategia de vacunación de la VLP de L1 del VPH16-L2 del VPH16 descrita en el presente documento desencadena con una única construcción tanto anticuerpos neutralizantes de alto
 35 título dependientes de la conformación de manera similar a la vacunación de VLP de la L1 del VPH16, y los niveles significativos de anticuerpos para una región altamente conservada de L2 que neutraliza de forma cruzada un amplio espectro de tipos patogénicos del VPH.

La cristalización de la VLP pequeña (T=1) de la L1 del VPH16 ha revelado la estructura atómica de la cápside vírica, en particular los bucles hipervariables de superficie que contienen los epítopos inmunodominantes y dependientes
 40 de la conformación que se reconocen por anticuerpos neutralizantes y determinan el serotipo vírico (Chen y col. (2000) Molecular Cell 5, 557-567). Para aumentar la inmunogenicidad de la L2, los péptidos que abarcan el extremo N-terminal de la L2 del VPH16 se insertaron en los sitios correspondientes del bucle DE de la L1 del BPV1 y la L1

del VPH16. La longitud tolerada del péptido de L2 insertado que aún permitió el ensamblaje de la VLP fue de 44 y 20 restos, respectivamente. La secuencia de aminoácidos del inserto parece como una limitación adicional para el ensamblaje de la VLP. Cabe destacar que el análisis de secuencia predice fuertemente la presencia de una región transmembrana a 45-67 que puede explicar el fracaso de las construcciones de 35-75 y 13-107 de L2 para ensamblarse, y su ausencia de todas las construcciones que se ensamblan. Estas observaciones amplían los estudios previos y confirman que el bucle DE inmunogénico es un sitio adecuado para la presentación de antígeno en dos géneros diferentes de PV.

Las vacunas basadas en la VLP de papilomavirus inducen fuertes respuestas inmunitarias humorales (Carter y col. (1994) *Virology* 199, 284-91; Christensen y col. (1994) *J Gen Virol* 75, 2271-6; Kirnbauer y col. (1992) (citado anteriormente) Rose y col. (1994) *J Gen Virol* 75, 2445-9), y mediadas por células para L1 y los antígenos incorporados (Handisurya y col. (2007) *Feb J* 274, 1747-1758; Lenz y col. (2001) *J Immunol* 166, 5346-55; Pinto y col. (2003) *J Infect Dis* 188, 327-38; Rudolf y col. (2001) *J Immunol* 166, 5917-24; Slupetzky y col. (2001) *J Gen Virol* 82, 2799-804; Yang y col. (2004) *J Immunol* 173, 2624-31; Zamora y col. (2006) *Immunol* 177, 2662-70). La respuesta de anticuerpos para la VLP depende fuertemente de la densidad de epítomos presentados en superficie (Bachman y col. (1997) *Ann Rev Immunol* 15, 235-70; Chackerian y col. (2002) *Jornal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950) 169, 6120-6). Los inventores descubrieron que los conejos inmunizados con VLP quiméricas naturales demostraron respuestas inmunitarias fuertes para L2 mediante ELISA, con, en promedio, títulos 5 veces más altos en comparación con las vacunas con proteínas interrumpidas con SDS (Tabla 2). Asumiendo que esta diferencia probablemente podría ser incluso mayor en ausencia de adyuvante, la exposición del péptido en las superficies de la VLP de la L1 parece representar una estrategia útil para superar la subdominancia inmunitaria de L2 en su ámbito natural.

Un examen exhaustivo de los epítomos de los linfocitos B en el extremo N-terminal de la L2 del VPH16 se llevó a cabo usando péptidos solapantes. Como los péptidos quiméricos 69-81 y 108-120 de BL1-16L2 se han publicado anteriormente (Slupetzky y col. (2007) (citado anteriormente)), los péptidos adyacentes se diseñaron sin solapamiento. La neutralización de los pseudoviriones homólogos del VPH16 se logró mediante inmunizaciones con proteínas quiméricas que comprenden los aa 13-154 de la L2 del VPH16 (Tabla 3a). Estas observaciones sostienen los hallazgos previos de que la respuesta protectora de anticuerpos neutralizantes para L2 de los tipos de PV divergentes está mediada por los 150 aa de N-terminal de la L2 del BPV4 (Campo y col. (1997) *Virology* 234, 261-6; Chandrachud y col. (1995) *Virology* 211, 204-8); la L2 del BPV1 (Pastrana y col. (2005b) *Virology* 337, 365-72); la L2 del CRPV-ROPV (Embers y col. (2002) (citado anteriormente)), la L2 del HPV16 (Embers y col. (2004) *Vaccine* 22, 670-80; Kawana y col. (1998) *Virology* 245, 353-9; Pastrana y col. (2005b) (citado anteriormente)).

La neutralización cruzada eficaz de un gran panel de tipos de VPH mucosales se restringió a los sueros generados contra los restos de aa 17-36 incorporados de la L2 del VPH16, el epítomo RG-1 anteriormente descrito (Gambhira y col. (2007b) (citado anteriormente)). Los restos en esta región altamente conservada entre los diferentes géneros y tipos de PV se determinaron previamente para interactuar con un receptor secundario de superficie celular, mientras que su implicación crítica en la infectividad vírica se asigna a una etapa más tardía de la infección.

El uso de alumbre-MPL como el adyuvante redujo la brecha entre las condiciones de inmunización de los estudios en animales dadas en el presente documento y las vacunas de subunidad de L1 establecidas. La formulación se aproxima al adyuvante patentado ASO4 de Cervarix®, cuyas características del adyuvante se han atribuido a la activación de inmunidad innata mediante vías de citocinas proinflamatorias así como la inducción de linfocitos B de memoria. Los patrones de anticuerpos neutralizantes entre los conejos individuales vacunados con la 17-36 de BL1-16L2 en adyuvante de Freund o alumbre-MPL difieren de manera considerable, mostrando diferencias de 1-2 log en el título, o incluso negatividad para algunos tipos, que podrían deberse a anticuerpos por debajo del nivel de detección, en lugar del diferente procesamiento y presentación de epítomos en individuos. En general, la neutralización cruzada se indujo en dos mamíferos diferentes y usando alumbre-MPL como adyuvante, que es aplicable para uso en seres humanos.

Lo más importante, los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos en el presente documento presumiblemente son protectores *in vivo* (Embers y col. (2002) (citado anteriormente); Gambhira y col. (2007a) (citado anteriormente); Gaukroger y col. (1996) (citado anteriormente)). La sensibilidad de los papilomavirus a la neutralización mediante antisueros de bajo título puede deberse en parte a la inusual cinética lenta de entrada en la célula que permite el acceso prolongado a anticuerpos neutralizantes (Culp y col. (2004) *Virology* 319, 152-61). Además, un modelo de exposición en vagina de ratines señala el hecho de que el virus inicialmente se une a la membrana basal del epitelio mecánicamente interrumpido y de manera eventual se adsorbe a las células epiteliales, mientras que retoma el contacto con la membrana basal (Roberts y col. (2007) *Nat Med* 13, 857-61).

A pesar de la modificación de la superficie de la VLP de la L1 mediante la inserción de la L2, la inmunización con la VLP del BL1-16L2 quimérico indujo anticuerpos anti-L1 de BPV1, independientemente de la longitud del péptido insertada. De manera similar, la VLP de 17-36 de 16L1-16L2 indujo altos títulos de anticuerpos neutralizantes del VPH16, similares a la vacuna de VLP de la L1 del VPH16 de ts, lo que indica que se conservan los principales epítomos inmunogénicos de L1. Es destacable, que la inmunización de conejos con la VLP natural de la 17-36 del 16L1-16L2 quimérico, con adyuvante de alumbre-MPL indujo una neutralización robusta de los tipos 16 / 18 / 31 / 45 / 52 / 58 de VPH de alto riesgo, los tipos 6 y 11 de bajo riesgo y el VPH beta de tipo 5, con títulos de neutralización

de aproximadamente 10 a 100 veces mayo cuando se compararon con los sueros generados contra la VLP de la 17-36 del BL1-16L2 comparable en condiciones idénticas de vacunación (Tabla 4). Estos resultados indican una presentación favorable del epítipo RG-1 en la composición de aa de la L1 del VPH16 como vehículo. Por lo tanto, se espera que los epítipos de neutralización cruzada en la región 17-36 altamente conservada de L2 de los tipos divergentes de VPH se puedan exponer de una manera análoga.

La VLP de la L1-L2 quimérica permite un amplio espectro de vacunas del VPH. Su posible uso se basa en la VLP de L1 como vehículo de vacunas, que están bien toleradas y proporcionan protección a largo plazo de 8 años desde la fecha. Como el rendimiento obtenido es similar el de la VLP de la L1 del VPH16 de ts (datos no mostrados), la vacuna de VLP de la L1 del VPH16- 17-36 de la L2 del VPH16 descrita en el presente documento pretende proporcionar una protección cruzada amplia a los tipos heterotípicos del VPH, sin elevados costes, además de protección de alto nivel y restringida al tipo frente al VPH 16 homólogo.

Ejemplo III. Caracterización adicional del espectro de neutralización cruzada basada en L2

Se inmunizaron dos conejos NZW 4 veces en las semanas 0, 4, 6, 8 con RG1-VLP (VPH16L1-16L2(17-36)) más adyuvante de alumbre-MPL (Charles River, Alemania). Los anticuerpos se extrajeron 2 semanas después de la 4ª inmunización y se ensayaron usando los ensayos de neutralización de pseudovirión recién establecido de los tipos 3, 32, 33, 38, 68, 76 del VPH (Helena Faust, Joakim Dillner, sin publicar). Los sueros preinmunitarios de los mismos conejos se usaron como controles. El antisuero de un conejo NZW que se había inmunizado con la VLP de HPV16L1 de tipo silvestre más adyuvante de Freund (primera inmunización con adyuvante de Freund completo (CFA), refuerzos con adyuvante de Freund incompleto (IFA)) se usaron como control adicional. Los sueros se diluyeron a 1:100, 1:1000 y 1:10.000 y se ensayaron dos veces. Los sueros que fueron no neutralizantes a dilución de 1:100 se ensayaron adicionalmente una vez a dilución de 1:50.

Los antisueros para RG1-VLP neutralizaron de manera cruzada los tipos 33, 68, 76 de VPH mucosal de alto riesgo, el VPH32 de tipo mucosal (que provoca la enfermedad de heck) y el VPH3 tipo alfa de la piel, con títulos desde 50 hasta 1.000 (Tabla 5, columnas 2, 4). Por el contrario, los sueros preinmunitarios de los mismos conejos fueron no neutralizantes en todos los ensayos (columnas 1, 3).

Además, la neutralización de bajo título del VPH32, 33 y 68 se detectó para el antisuero n.º 4835 para la VLP de la L1 del VPH16 de tipo silvestre (columna 5). Es de destacar que el último suero se había generado usando el adyuvante de Freund fuerte.

Tabla 5. Ensayos de neutralización de pseudovirión. Los títulos mostrados se corresponden con la dilución recíproca más alta de los sueros pre(inmunitarios) de conejo indicados para RG1-VLP, o para la VLP de la L1 del VPH16 de ts, que neutralizaron los tipos de pseudovirión del VPH indicados.

	1	2	3	4	5
HPV3	no	1000	no	1000	no
HPV32	no	50	no	100	50
HPV33	no	100	no	100	100
HPV38	no	no	no	no	no
HPV68	no	1000	no	100	50
HPV76	no	100	no	100	no

1, preinmunización del NZW n.º 1

2, 4ª postinmunización del NZW n.º 1 con RG1-VLP + AlumbreMPL

3, preinmunización del NZW n.º 2

4, 4ª postinmunización del NZW n.º 2 con RG1-VLP + AlumbreMPL

5, 4ª postinmunización del NZW n.º 4835 con VLP de L1 del VPH16 ts + CFA/IFA

Ensayo de neutralización del virión VPH2a (RT-PCR)

A continuación, los inventores determinaron la capacidad de los antisueros para RG1-VLP para neutralizar el VPH2a de tipo alfa de la piel, que está estrechamente relacionado con el VPH27 y 57. El VPH1, 2, 27 y 57 son los tipos de VPH más prevalentes detectados en el 96 % de las verrugas comunes cutáneas positivas en VPH (de Koning y col., J Clin Microbiol). Además, se ha descrito una larga duración de las verrugas relacionadas con el VPH2 (Rubben y col. (1997) Arch Dermatol Res 289, 337-340), y el VPH2 y el VPH57 también se han aislado de las lesiones de la mucosa. Para desarrollar un ensayo de neutralización *in vitro* basado en un virión infeccioso, se aisló el VPH2a natural de una gran verruga plantar de un paciente que padecía de múltiples verrugas extensivas de la piel. Para determinar el tipo de VPH, se aisló el ADN genómico del tejido de la verruga y se amplificó por PCR mediante 40 ciclos usando los cebadores generales CP4/CP5 o PPF1/CP5, dirigidos a la región E1:

PPF1 5'-(nt2082)-AAC-AAT-GTG-TAG-ACA-TTA-TAA-ACG-AGC-(nt 2108)-3' (SEQ ID NO:86)

CP4 5'-(nt1942)-ATG-GTA-CAR-TGG-GCA-TWT-GA-(nt1961)-3' (SEQ ID NO:87)

CP5 5'-(nt2400)-GAG-GYT-GCA-ACC-AAA-AMT-GRC-T-(nt2378)-3' (SEQ ID NO:88). Los amplímeros se secuenciaron y el BLAST de nucleótidos (ncbi.nlm.nih.gov) reveló el 100 % de coincidencias con el VPH2a (número de referencia X55964, a partir de la fecha de presentación de la presente solicitud).

El tejido de la verruga se retiró usando una cuchilla de afeitar y, tras la adición de un volumen igual de PBS, se congeló en nitrógeno líquido. El tejido se descongeló y se homogeneizó de manera mecánica usando perlas de acero usando el instrumento Fast Prep-24 a 4,0 M/S, 2 veces 20 segundos (MP Biomedicals, LLC). Tras una centrifugación de 5 min a 14.000 rpm en una microcentrífuga de Eppendorf, el sobrenadante que contiene el virión se recolectó y se almacenó en alícuotas a -80 °C.

El ensayo de neutralización se desarrolló en analogía con un procedimiento descrito (Smith y col. (1995) J. Invest. Dermatol. 105, 438-444; Shafti-Keramat y col. (2003) J Virol 77, 13125-13135). En resumen, los queratinocitos (3x 10⁵ células) se cultivaron en placas de cultivo de tisular de 60 mm de diámetro. Al día siguiente, el medio de cultivo se aspiró y las células se infectaron con 2 µl de solución del virión del VPH2 en 1 ml de DMEM (Invitrogen) se preincubaron con la dilución indicada de suero preinmunitario o inmunitario para RG1-VLP, o solo medio como control, antes de añadirlo a las células, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con balanceo suave cada 15 min y después se alimentó con 4 ml de DMEM reciente + FC al 10 % + antibiótico/antimicótico al 1 % (Invitrogen). Como control de especificidad, los viriones se incubaron con antisuero generado contra la VLP de la L1 del VPH2 (un generoso regalo de Tilo Senger, German Cancer Research Center, Heidelberg) o la VLP de la L1 ts/L2ts del VPH16. Tras 24 horas de incubación, el ARN celular total se recolectó usando Tri Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio). Para la síntesis de ADNc monocatenario, se usaron 15 cebadores oligop(dT) (Roche). El ARNm cortado y empalmado E1^AE4 del VPH2 se detectó mediante dos rondas de PCR anidada de 30 ciclos usando los siguientes cebadores: 1^o ronda: VPH2 UO: 5' -GGGTGGTAACTACCTGCTG-3' (SEQ ID NO:89), VPH2 DO: 5'-CTCTTGTCAGGAAGTCTGTACG-3' (SEQ ID NO:90); 2^a ronda: VPH2 UI: 5'-CAGAACCGTCCGGCTGGTGG -3' (SEQ ID NO:91) HPV2 DI: 5'-CCCACCCGCCAGTGCCAC-3' (SEQ ID NO:92). Los tamaños finales esperados de los amplicones de la PCR fueron de 556 pb para el ARNm cortado y empalmado del VPH2 y de 429 pb para el ARNm de actina beta cortado y empalmado.

Como se muestra en la Figura 5, el antisuero anti-RG1 neutralizó los viriones del VPH2 tal como se indica mediante la ausencia de ARN vírico detectable (carril 5), mientras que el control sin suero (carril 2), el suero preinmunitario (carril 4) y un suero generado contra la VLP de L1-ts/L2-ts del VPH16 (carril 6) fueron no neutralizantes. Como controles apropiados, no se detectó ARN vírico cuando no se añadieron virus a las células (carril 1), o cuando se usó un suero neutralizante anti-VLP de la L1 del VPH2 (carril 3).

Para determinar los títulos de neutralización sobre el tiempo, se inmunizaron dos conejos adicionales con RG1-VLP más alumbre-MPL a 0, 4, 6, 8 semanas, y los sueros se analizaron 10 meses después del tercer refuerzo. Los títulos de los antisueros neutralizantes (de neutralización cruzada) fueron detectables con un descenso de 10 a 100 veces o se volvieron indetectables, cuando se compararon con los títulos de los sueros extraídos dos semanas tras el tercer refuerzo (Tabla 6, comparar columna '10 meses' con columna '3^{er} refuerzo'). De manera importante, un refuerzo adicional de RG1-VLP más alumbre-MPL de conejos en el mes 10 aumentó los títulos de sueros extraídos dos semanas después a los niveles anteriores al mínimo (véase la Tabla 6, columna '4^o refuerzo'). Estos datos indican una respuesta de memoria de linfocitos B funcionales para los epítomos de neutralización (cruzada) de RG1-VLP.

Tabla 6: Inmunización de refuerzo de dos conejos NZW con RG1-VLP (VPH16L1-16L2 (17-36)) 10 meses tras la inmunización principal]

Pseudovirion es	título de neutralización NZW n.º 1			NZW n.º 2		
	3 ^{er} refuerzo	10 meses de seguimiento	4 ^o refuerzo	3 ^{er} refuerzo	10 meses de seguimiento	4 ^o refuerzo
VPH 16	100.000	1.000	100.000	100.000	1.000	100.000
VPH 18	1.000	50	1.000	1.000	100	1.000
VPH 31	10.000	100	1.000	1.000	100	10.000
VPH 45	1.000	0	1.000	100	100	1.000
VPH 52	100	0	1.000	50	0	50
VPH 58	1.000	0	10.000	1.000	100	1.000
VPH 6	100	0	1000	50	0	100
VPH 11	100	?	?	0	?	?
VPH 5	100	0	1.000	50	0	100

Tabla 6: Se inmunizaron dos conejos NZW con RG1-VLP más alumbre-MPL tal como se describe anteriormente, y el suero extraído 2 semanas tras la cuarta inmunización (3^{er} refuerzo). 10 meses más tarde, se extrajeron los suero (10 meses tras uo) y ambos conejos recibieron un refuerzo adicional de RG1-VLP más adyuvante de alumbre-MPL y los sueros se extrajeron de nuevo dos semanas más tarde (4^o refuerzo). Los sueros se analizaron mediante diluciones de punto final en serie de 10 veces en los ensayos de neutralización de pseudoviriones indicados. Los títulos de neutralización se muestran. El símbolo de interrogación (?) indica que los respectivos títulos de neutralización no se han determinado.

Conclusión: La inmunización con VLP de L1-RG1 quimérica del VPH16 en adyuvante aplicable para uso humano

puede inducir respuestas de anticuerpos de amplio espectro de larga duración para los papilomavirus mucosales de alto riesgo, de bajo riesgo y los divergentes cutáneos alfa y beta.

5 Las realizaciones se deben considerar como meramente ilustrativas, y no limitativas del alcance de la invención de ninguna manera. La divulgación completa de todas las solicitudes, patentes y publicaciones (incluyendo la solicitud provisional de patente 61/168.445, presentada el 10 de abril de 2009) citadas anteriormente y en las figuras se incorporan en el presente documento an su integridad a modo de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de partícula de tipo virus (VLP), ensamblada a partir de un polipéptido quimérico que comprende una proteína L1 de papilomavirus (PV) en la que se inserta un péptido presentado en superficie que consiste en la siguiente secuencia de una proteína L2 de papilomavirus:
- 5 a) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV (SEQ ID NO:9) o
b) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:56) o
c) LYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:57)
- en la que el péptido L2 se inserta en el bucle DE de la proteína L1.
2. La VLP de la reivindicación 1, en la que
10 la proteína L1 es del VPH16, y el péptido de L2 se inserta entre los aminoácidos 136 y 137 en el bucle DE de la proteína L1 (SEQ ID NO:85); o
la proteína L1 es del BPV1, y el péptido de L2 se inserta entre los aminoácidos 133 y 134 en el bucle DE de la proteína L1 (SEQ ID NO:83).
3. La composición de VLP de la reivindicación 1, en la que las proteínas L1 y L2 son de un virus del papiloma humano (VPH) o en la que la proteína L1 es de un BPV o en la que la proteína L1 y/o la proteína L2 son de un PV que no es un VPH.
4. La composición de VLP de la reivindicación 1, en la que la proteína L1 es una variante, de manera que la proteína L1 pueda tolerar la inserción de un péptido de L2 adecuado, sin perder su antigenicidad, y se pueda ensamblar en una VLP o al menos en un capsómero.
- 20 5. La composición de VLP de la reivindicación 1 o de la reivindicación 4, que es una composición inmunogénica, preferentemente que es inmunogénica frente a los papilomavirus de tipo mucosal de alto riesgo o de bajo riesgo, cutáneo de bajo riesgo, y/o cutáneo beta o que es inmunogénica frente a tres o más de los siguientes papilomavirus: los tipo mucosal de alto riesgo VPH 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, 68 o 76; los tipo mucosal de bajo riesgo VPH 6, 11; los tipos de VPH 13, 32; los tipo cutáneo de bajo riesgo VPH1, 2, 3, 4, 7, 10, 27, 57; y/o tipo beta VPH 5, 8, 9, 12, 14, 15, 38.
- 25 6. La composición de VLP de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante.
7. Una vacuna, que comprende una composición de VLP de la reivindicación 1 y un adyuvante, preferentemente eficaz frente a los papilomavirus humanos o eficaz frente a los papilomavirus de tipo mucosal de alto riesgo, de bajo riesgo, de tipo cutáneo, y/o de tipo beta.
- 30 8. La vacuna de la reivindicación 7, en la que la composición se formula para la administración mediante inhalación, ingestión, en un vector vírico o bacteriano, o como un componente de un lubricante sexual o en el que la composición es una formulación para inyección intramuscular (*i.m.*) o administración subcutánea.
9. La vacuna de la reivindicación 7, en la que la composición está en una forma liofilizada o en polvo.
10. Un polipéptido quimérico, que comprende una proteína L1 de papilomavirus (PV), en la que se inserta un péptido expuesto en superficie que consiste en una de las siguientes secuencias de una proteína L2 de papilomavirus:
- 35 a) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV (SEQ ID NO:9) o
b) QLYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:56) o
c) LYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (SEQ ID NO:57)
- en la que el péptido L2 se inserta en el bucle DE de la proteína L1.
- 40 11. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico de la reivindicación 10.
12. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11, que está unido de manera operativa a una secuencia de control de la expresión.
13. Una célula hospedadora, que comprende un polipéptido quimérico de la reivindicación 10, un ácido nucleico de la reivindicación 11, o un vector de expresión de la reivindicación 12.
- 45 14. Un procedimiento de fabricación de una composición de VLP o de capsómero, que comprende incubar un polipéptido quimérico de la reivindicación 10 en condiciones adecuadas para el autoensamblaje.
15. Una composición de VLP de la reivindicación 1 para su uso en la inmunización o la vacunación de un sujeto frente a un PV, o para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria frente al VPH en un sujeto, preferentemente en la que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular,
- 50

específica de antígeno o innata, o para su uso en el tratamiento de una infección por PV en un sujeto que tiene una infección por PV o en riesgo de estar expuesto al PV o para su uso en la prevención de cáncer de cuello de útero, anogenital, orofaríngeo, o un precáncer, preferentemente para su uso en la prevención de cáncer de cuello de útero.

16. Un kit que comprende una composición de VLP de la reivindicación 1.

5 17. Una composición de capsómero, ensamblada a partir de un polipéptido quimérico que comprende una proteína L1 de papilomavirus (PV), en la que se inserta un péptido expuesto en superficie que consiste en una de las siguientes secuencias de una proteína L2 de papilomavirus:

- a) QLYKTCKQAGTCCPDIIIPKV (SEQ ID NO:9) o
- b) QLYKTCKQAGTCCPDIIIPKVEG (SEQ ID NO:56) o
- 10 c) LYKTCKQAGTCCPDIIIPKVEG (SEQ ID NO:57)

en la que el péptido L2 se inserta en el bucle DE de la proteína L1.

18. Una composición de VLP de la reivindicación 1 para su uso en la inducción de una reacción inmunológica para un VPH de tipo piel en un sujeto.

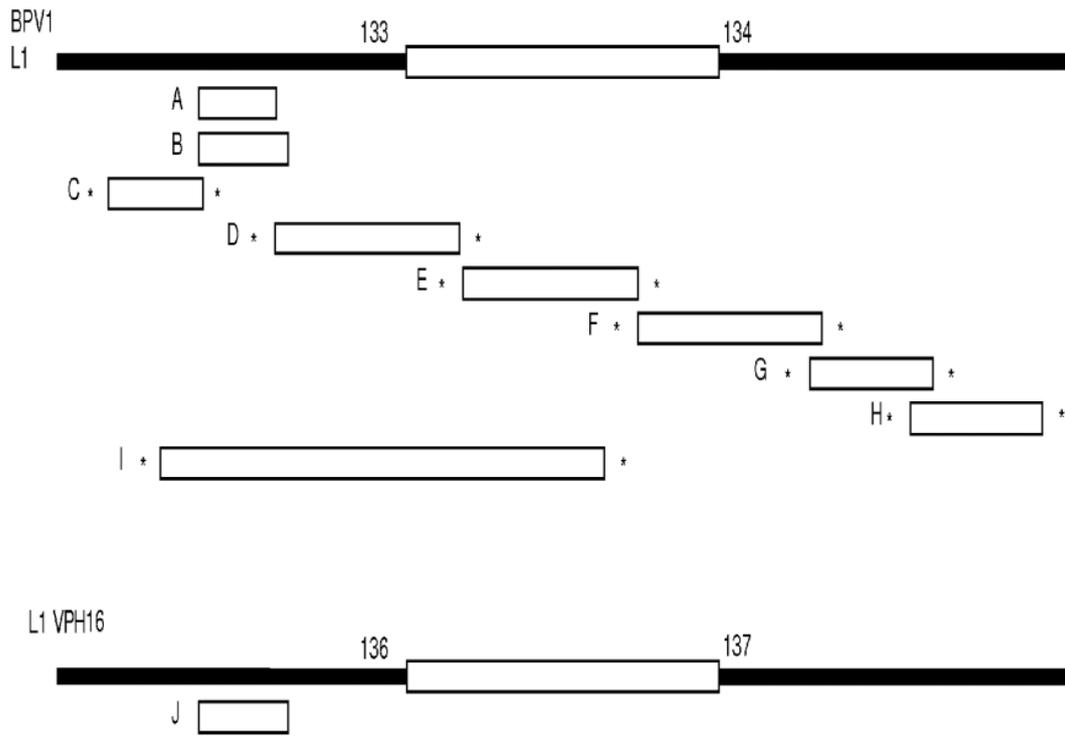


FIG. 1

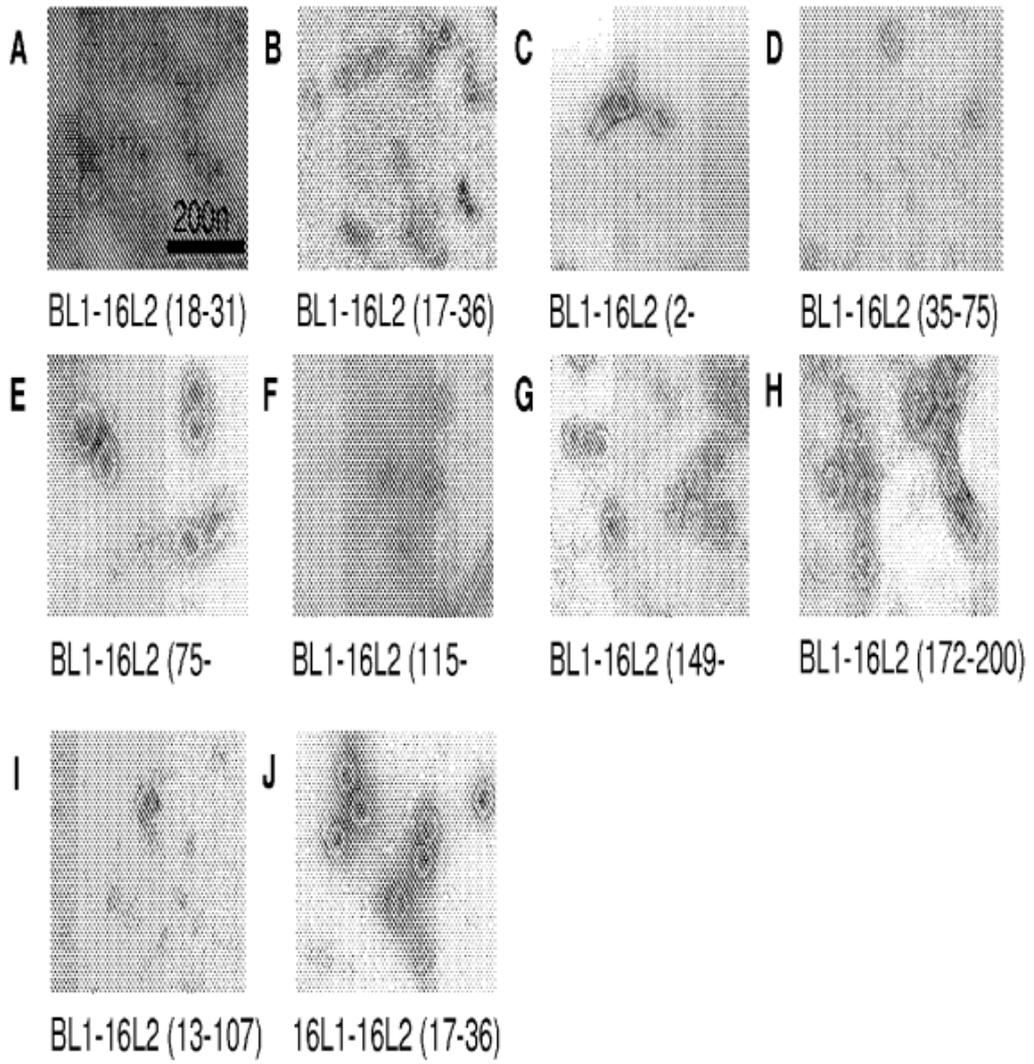


FIG. 3

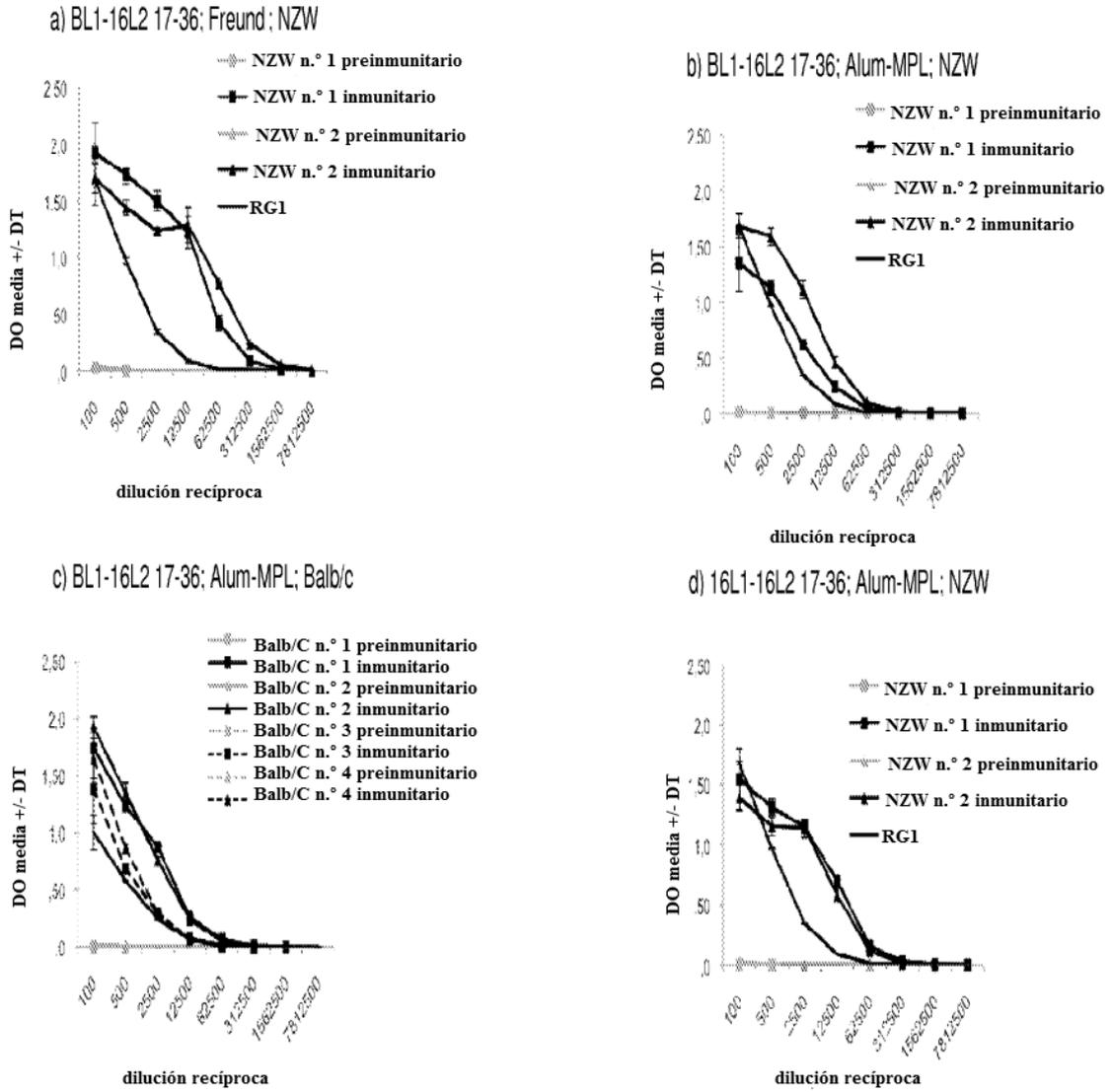


FIG. 4

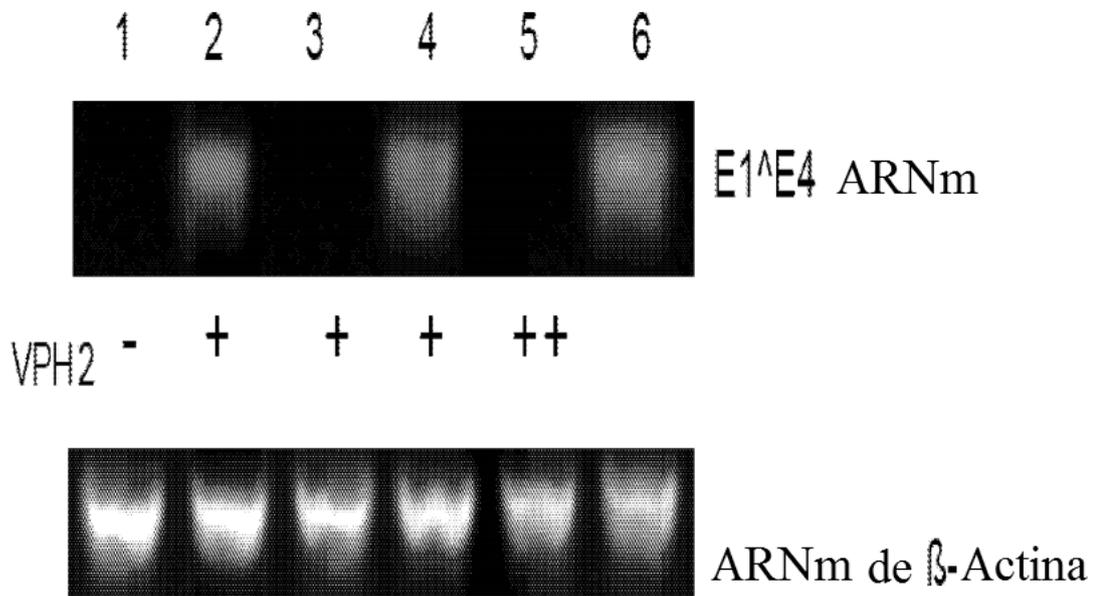


FIG. 5

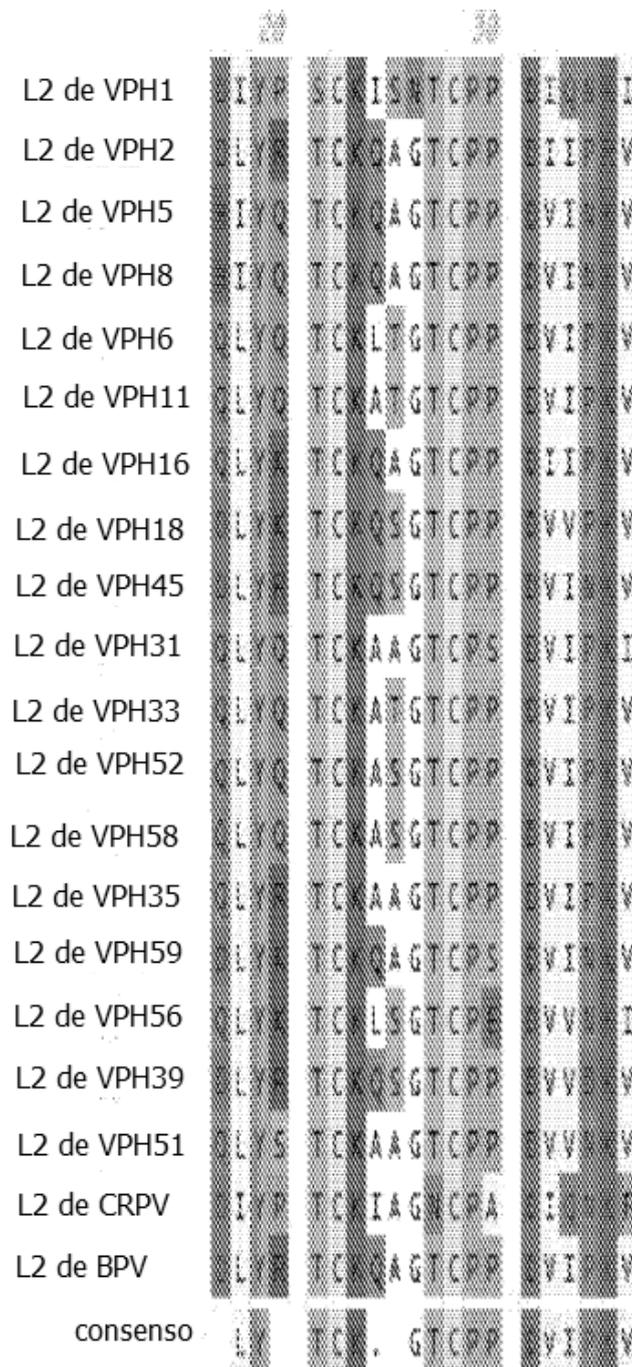


FIG. 6