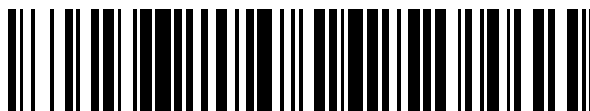


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 474**

51 Int. Cl.:

C07K 14/025	(2006.01)
A61K 39/12	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 14/435	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2008 PCT/JP2008/061569**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2008 WO09001867**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008 E 08777585 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2168977**

54 Título: **Antígeno vacuna capaz de inducir anticuerpos de reacción cruzada y neutralizante contra el virus del papiloma humano del tipo de alto riesgo**

30 Prioridad:

26.06.2007 JP 2007167154

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2018

73 Titular/es:

**JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION
(100.0%)
13-4, Nihonbashi Kodenma-cho, Chuo-ku
Tokyo 103-0001, JP**

72 Inventor/es:

**KANDA, TADAHITO y
KONDO, KAZUNARI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 688 474 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

Antígeno vacuna capaz de inducir anticuerpos de reacción cruzada y neutralizante contra el virus del papiloma humano del tipo de alto riesgo

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente japonesa No. 2007-167154 presentada el 26 de junio de 2007.

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un antígeno vacuna que induce anticuerpos neutralizantes de reacción cruzada contra virus de papiloma humano del grupo de alto riesgo. En particular, la presente invención se refiere a una proteína quimérica compuesta por la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 particular del virus del papiloma humano genotipo 16 insertado en un sitio particular de la misma y la cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica. La cápside de acuerdo con la presente invención es útil como un antígeno para uso en una vacuna para la prevención de la infección por virus del papiloma humano que puede conducir a cáncer de cuello uterino.

15 Estado del arte

El virus del papiloma humano (VPH) (Figura 1) es un virus de ADN pequeño, y hay 100 o más genotipos. Quince genotipos (genotipos de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 73) causan cáncer de cuello uterino. El VPH16 se detecta en 50 a 60% del cáncer de cuello uterino. El VPH18 se encuentra con frecuencia en Europa y los Estados Unidos, mientras que VPH52 y VPH58 se encuentran con frecuencia en Japón. Aunque se llevó a cabo un examen masivo para el diagnóstico precoz en Japón, todavía hay inicio del mismo en 15.000 pacientes y la muerte de 2.500 pacientes cada año.

20 La cápside del VPH tiene un esqueleto icosaédrico regular que consiste en 72 pentámeros de proteína L1 (capsómeros) y 12 moléculas de proteína L2 unidas a la misma. Ambos terminales de la proteína L2 están ubicados en la cápside, pero parte de la región N-terminal está localizada en la superficie de la cápside (región superficial L2) (Figura 2). La expresión de la proteína L1 en una gran cantidad mediante la técnica de ADN recombinante produce partículas similares a virus (PSV). La inoculación de las PSV o la proteína L2 del virus del papiloma bovino o de conejo de cola blanca hace que los animales inoculados sean resistentes a la exposición viral. La Figura 2 es una vista esquemática en sección transversal que ilustra el VPH y las PSV.

25 Actualmente no hay una línea celular cultivada que permita la proliferación del VPH. Los pseudovirus se preparan para controlar la infección por VPH. La introducción de un plásmido que expresa fosfatasa alcalina secretora (SEAP) que tiene el origen de replicación de SV40, un plásmido que expresa la proteína L1 y un plásmido que expresa la proteína L2 en células 293 humanas que expresan el antígeno de SV40T conduce a la incorporación del plásmido que expresa SEAP replicada en la cápside L1/L2, produciendo un pseudovirus infeccioso (Figura 3). La actividad de los anticuerpos de neutralización se determina midiendo la actividad de inhibición de la infección pseudoviral (documento 1 que no es de patente).

30 Cada uno de los antiseros obtenidos por inoculación de las PSV del VPH en animales tiene una actividad de neutralización de tipo específico. Merck desarrolló una vacuna en combinación de las PSV del VPH16 y del VPH18 y las PSV del VPH6 y del VPH11, que son posibles causas de condiloma acuminado (benigno), mientras que GlaxoSmithKline desarrolló una vacuna en combinación de las PSV del VPH16 y del VPH18 (Documentos 2 y 3 que no son de patente).

35 Se demostró en ensayos clínicos a gran escala que estas vacunas tienen una acción preventiva de infección de tipo específico, y la vacuna de Merck fue aprobada en 2006 por la FDA y la Comisión de las Comunidades Europeas y se vende en los Estados Unidos y los países de la CE.

40 Como se describió anteriormente, la inmunización de la cápside L1 del VPH en animales conduce a la inducción de una respuesta inmune de tipo extremadamente específico. Los resultados preliminares en una prueba clínica mediante el uso de la vacuna de la cápside L1 del VPH16 mostraron que la vacuna era efectiva para prevenir la infección por VPH16, pero casi no es efectiva para prevenir otros genotipos del VPH. En consecuencia, para la prevención de la aparición de cáncer de cuello uterino con vacunas, existe la necesidad de desarrollar un antígeno vacuna que sea eficaz al menos para todos los VPH de alto riesgo.

45 Los inventores habían desarrollado previamente un antígeno vacuna, usando un epítipo de neutralización común para los VPH de alto riesgo que está presente en la región 108-120 de aminoácidos de la proteína L2 del VPH16. Sin embargo, el epítipo tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente 60 a 75% con las proteínas L2 de alto riesgo, y el anticuerpo inducido de este modo se une a múltiples VPH de alto riesgo pero es más baja en eficacia de unión que a VPH16. Por lo tanto, subsiste la necesidad por un antígeno que tenga una aparición de tipo más común.

55

Los inventores descubrieron que era posible preparar un antígeno vacuna capaz de inducir un anticuerpo neutralizante de tipo común más potente produciendo una proteína quimérica que tenga la proteína L1 del VPH16 y la región de aminoácidos 64-81 de la proteína L2 del VPH16 insertada a la misma y que el antígeno vacuna era un antígeno con una aparición de tipo más común que era compatible al menos con todos los VPH de alto riesgo, y presentó antes una solicitud de patente (documento WO2007/018049, documento 1 de patente). Además como se describió anteriormente, en vista del hecho de que las partículas formadas a partir de la proteína quimérica compuesta por la proteína L1 del VPH16 y una región de aminoácidos 108-120 de la proteína L2 del VPH16 insertada en la proteína L1 del VPH16, tienen una fuerte inmunogenicidad y potencial para inducir anticuerpos neutralizantes, que son comunes a los VPH de alto riesgo, una proteína quimérica que consiste en la proteína quimérica que tiene la región adicional de aminoácidos 64-81 insertada por una región de aminoácidos 109-117 de la proteína L2 del VPH16 fue proporcionada en el documento 1 de patente.

Documento 1 que no es de patente: Pastrana, DV, Buck, CB, Pang, AA, Thompson, CD, Castre, PE, FitzGerald, DC, Kruger, Kjaer, S., Lowy, DR, Schiller, JT, 2004. Reactivity of human sera in a sensitive, high throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for VPH 16 and VPH 18. *Virology*. 321: 205-216.

Documento 2 que no es de patente: Villa, LL, et al.: Prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncology* 6, 271-278, 2005.

Documento 3 que no es de patente: Harper, D.M., et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like Particle vaccine against human papillomavirus type 16 and 18: follow up from a randomized control trial. *Lancet* 367 (9518), 1247-1255.

Documento 4 que no es de patente: Kondo, K. et al Neutralization of VPH16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the VPH16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* 358 (2), 266-272.

Documento 1 de patente: WO2007/018049

Documento 2 de patente: WO 2005/097987.

Las vacunas del VPH actualmente disponibles en el mercado son efectivas solo para VPH16 y VPH18 entre 15 VPH de alto riesgo. Cada PSV induce un anticuerpo neutralizante específico de cada tipo y, por lo tanto, se necesita un cóctel de 15 tipos de PSV para la inducción de anticuerpos contra todos los VPV de alto riesgo, lo que dificulta la preparación de un antígeno vacuna práctico. Por lo tanto, existe una demanda para el desarrollo de un antígeno vacuna que induzca un anticuerpo neutralizante de reacción cruzada.

El antígeno descrito en el documento 1 de patente es un antígeno compatible al menos con todos los VPH de alto riesgo que tienen una aparición de tipo más común. Sin embargo, tenía el siguiente problema. Los pseudovirus infecciosos utilizados en el estudio del documento 1 de patente fueron solo VPH16 y VPH18, y el antígeno descrito en el documento 1 de patente mostró actividad neutralizante favorable para estos pseudovirus infecciosos. Sin embargo, en el experimento de neutralización posterior utilizando pseudovirus infecciosos VPH31, VPH52 y VPH58 recientemente desarrollados por los inventores, el antígeno descrito en el documento 1 de patente tenía una actividad neutralizante menor para VPH31, VPH52 y VPH58.

El documento 2 de patente divulga una cápside que consiste en un agregado de proteínas quiméricas que comprende la proteína L1 del VPH16 que tiene al menos un epítipo L2 del VPH insertado en una región bucle de la proteína. Sin embargo, no divulga la región 56-75 de aminoácidos de la proteína L2 del VPH16.

El documento 4 que no es de patente divulga la inmunización de conejos con péptidos sintéticos que representan segmentos de la región superficial de L2 del VPH16. No divulga ni una cápside que contenga el epítipo L2 del VPH16 de los aminoácidos 56-75, ni una proteína quimérica con una inserción de este epítipo en la posición 430-433 de la proteína L1 del VPH16. Además, el documento 4 que no es de patente 4 sugiere que los anticuerpos contra el epítipo 56-75 solo no serían suficientes para una neutralización cruzada eficiente.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un antígeno vacuna capaz de inducir un anticuerpo neutralizante de reacción cruzada para virus de papiloma humano del grupo de alto riesgo.

Resumen de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es una cápside que es un agregado formado por ensamblaje de proteína quimérica compuesta de proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que

la región para la inserción del epítipo L2 es una región de los aminoácidos 430 a 433 y el epítipo L2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por: GGLGIGTGSSTGGRTGYIPL (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 56-75).

La cápside de acuerdo con la presente invención incluye las siguientes formas de realización típicas.

- 1) El agregado es un agregado formado por el ensamblaje de múltiples capsómeros pentámeros, cada uno de los cuales está compuesto por cinco moléculas de proteína quiméricas.
- 2) El agregado formado por el ensamblaje de múltiples capsómeros pentámeros tiene una estructura de partícula.
- 5 3) El número de capsómeros pentámeros que constituyen el agregado está en el intervalo de 65 a 80.
- 4) El número de capsómeros pentámeros que constituyen el agregado es 72.
- 5) La cápside se usa para la producción de una vacuna de la cápside L1.

10 La presente especificación también se refiere a la cápside de acuerdo con la presente invención en la que el epítipo L2 comprende aminoácidos que tienen dicha secuencia de aminoácidos de la cual uno o más aminoácidos se eliminan o sustituyen o a la que se agregan uno o más aminoácidos, en el que los aminoácidos proporcionan a la cápside una capacidad que induce un anticuerpo neutralizante cruzado similar al del VPH que tiene el epítipo L2 original.

15 Un segundo aspecto de la presente invención es una mezcla de la cápside que comprende dos o más tipos de cápsides, en la que los dos o más tipos de cápsides comprenden una cápside como se describió anteriormente y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica compuesta por la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que

20 la región para la inserción del epítipo L2 es una región de aminoácidos 430 a 433 y el epítipo L2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por: LYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 18-38) o DPVGPLDPSIVSLVEESSFI (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 96-115).

Las mezclas de cápside de acuerdo con la presente invención incluyen las siguientes formas de realización típicas.

- 1) La mezcla de la cápside comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 18-38 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 56-75.
- 25 2) La mezcla de la cápside comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 18-38 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115.
- 3) La mezcla de la cápside comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 56-75 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115.
- 30 4) La mezcla de la cápside comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 18-38, una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 56-75, y cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115.
- 35 5) La mezcla de la cápside se usa para la producción de una vacuna de cápside L1.
- 6) La mezcla de la cápside se usa para la producción de una vacuna de cápside L1 que puede inducir los anticuerpos neutralizantes contra al menos los virus del papiloma humano 16, 18, 31, 52 y 58.

Un tercer aspecto de la presente invención es

40 una proteína quimérica compuesta por la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que la región bucle para la inserción del epítipo L2 es una región de aminoácidos 430 a 433 y el epítipo L2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por: GGLGIGTGSGTGGRTGYIPL (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 56-75).

45 La presente especificación también describe la proteína quimérica de acuerdo con la presente invención en la que el epítipo L2 tiene dicha secuencia de aminoácidos de la que uno o más aminoácidos están eliminados o sustituidos o a la que se le añaden uno o más aminoácidos, en la que los aminoácidos proporcionan la cápside constituida por la proteína quimérica con capacidad para inducir un anticuerpo neutralizante cruzado similar al del VPH que tiene el epítipo L2.

Un cuarto aspecto de la presente invención es un método para producir la cápside de acuerdo con la presente invención, en el que la cápside se forma mediante el ensamblaje de la proteína quimérica anterior.

Un quinto aspecto de la presente invención es el método para producir la mezcla de la cápside de acuerdo con la presente invención, que comprende preparar dos o más tipos de cápsides mediante el método de acuerdo con el método para producir de la cápside de la presente invención y mezclar las cápsides resultantes.

5 También se describe en la presente memoria descriptiva un complejo de hemocianina de lapa californiana y epítipo L2 del virus del papiloma humano genotipo 16, teniendo el epítipo L2 una secuencia de aminoácidos representada por:

LYKTCKQAGTCCPDIIPKVEG (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 18-38),

GGLGIGTGSGTGGRTGYIPL (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 56-75) o

DPVGPLDPSIVSLVEESSFI (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 96-115).

10 En un ejemplo típico del complejo de acuerdo con la presente memoria descriptiva, la hemocianina de lapa californiana y el epítipo L2 están unidos entre sí a través de la cisteína.

La presente invención proporciona un antígeno vacuna de cápside L1 en el que una estructura de partícula tiene una fuerte actividad inductora de inmunidad, y el antígeno vacuna de cápside L1 es capaz de presentar un antígeno fuerte del epítipo L2 del VPH, y que también es capaz de inducir un anticuerpo neutralizante, en particular, inducir
15 un anticuerpo neutralizante para VPH16, 18, 31, 52 y 58. Considerando la homología de las secuencias de aminoácidos de L2 en los 15 tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo descritos anteriormente, el antígeno vacuna de la cápside L1 para inducir un anticuerpo neutralizante para VPH16, VPH18, VPH31, VPH52 y VPH58 de acuerdo con la presente invención es muy probablemente un antígeno que puede cubrir casi todos los 15 tipos del VPH de alto riesgo.

20 Las vacunas de PSV ya se comercializaron, y se demostró que tienen una acción de prevención de infecciones de tipo específico. La PSV quimérica desarrollada por los inventores, que es un antígeno que consiste en el antígeno vacuna actual y un epítipo L2 de neutralización cruzada adicional, retiene el epítipo neutralizante de la vacuna actual y, por lo tanto, induce un anticuerpo neutralizante específico del VPH16 y también un anticuerpo neutralizante de reacción cruzada para VPH18, VPH31, VPH52 y VPH58. La PSV está compuesta por 360 moléculas de proteína
25 L1, y por lo tanto, la PSV quimérica tiene 360 epítopos L2 de neutralización cruzada. Es un nuevo antígeno vacuna en una estructura de partícula que tiene una fuerte actividad inductora de inmunidad y que presenta fuertemente el epítipo L2 de neutralización cruzada.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

(Cápside L1)

30 La cápside L1 de acuerdo con la presente invención es una cápside que es un agregado formado por ensamblaje de proteína quimérica compuesta de proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 del virus del papiloma humano genotipo 16 que se inserta en una región bucle de la Proteína L1 del VPH16.

Como se describió anteriormente, la partícula del VPH es una cápside icosaédrica regular que consiste en 72 capsómeros, cada uno de los cuales contiene cinco moléculas de proteína L1. La expresión de alto nivel de la
35 proteína L1 en la célula da como resultado la acumulación de las proteínas L1 en el núcleo, formando cápsides de forma autónoma. La cápside formada solo con las proteínas L1 se llama cápside L1 o partículas similares a virus (PSV). La expresión simultánea de proteínas L1 y L2 produce una cápside L1/L2 (o PSV L1/L2) que contiene 12 moléculas de proteína L2 en la cápside L1. Sin embargo, la cápside L1 y la cápside L1/L2 no se diferencian entre sí mediante microscopía electrónica.

40 La cápside L1 de acuerdo con la presente invención es una cápside basada en la cápside L1 del VPH16. Debido a que hay muchos genotipos del VPH, cada cápside está indicada en principio con un genotipo tal como VPH16 o VPH58. Por lo tanto, por ejemplo, la cápside L1 del VPH16 se designa como cápside L1 del genotipo 16.

La cápside L1 de acuerdo con la presente invención es un agregado formado por el ensamblaje de proteína quimérica, que tiene epítopos L2 del VPH16 insertados en la proteína L1 del VPH16. En lo sucesivo, la proteína quimérica significa una "proteína quimérica que tiene un epítipo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la
45 proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16", y la presente invención incluye tales proteínas quiméricas.

El epítipo L2 del VPH16 insertado en la proteína L1 para la producción de la proteína quimérica de acuerdo con la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos representada por: GGLGIGTGSGTGGRTGYIPL (epítipo L2
50 56-75). El epítipo L2 del VPH16 insertado en la proteína L1 para la producción de la proteína quimérica de acuerdo con la presente especificación puede tener, alternativamente a la secuencia de aminoácidos representada por GGLGIGTGSGTGGRTGYIPL (epítipo L2 56-75), una secuencia de aminoácidos representada por:

LYKTCKQAGTCCPDIIPKVEG (epítipo L2 18-38) o

DPVGPLDPSIVSLVEESSFI (epítopo L2 96-115).

5 El epítopo L2 18-38 tiene 21 aminoácidos en la región de aminoácidos 18-38 de la proteína L2 del VPH16. El epítopo L2 56-75 tiene 20 aminoácidos en la región de aminoácidos 56-75 de la proteína L2 del VPH16. El epítopo L2 96-115 tiene 20 aminoácidos en la región de aminoácidos 96-115 de la proteína L2 del VPH16 (en la que los aminoácidos 101° y 112° se reemplazan respectivamente con leucina y serina).

En la presente invención, los residuos de aminoácidos en la proteína se numeran a partir del extremo amino y, por ejemplo, el quincuagésimo aminoácido se designa como el aminoácido 50.

10 La región superficial de L2 se une a múltiples proteínas celulares. La introducción de mutaciones de sustitución de aminoácidos produce una pérdida de infectividad, lo que indica que la región superficial de L2 tiene una función esencial para la infección por VPH (Figura 4). La secuencia de aminoácidos de esta región se conserva bastante bien en todas las proteínas L2 del VPH de alto riesgo (Figura 5). Los inventores estudiaron antisueros obtenidos inmunizando conejos con péptidos sintéticos que tienen la secuencia de aminoácidos en la región superficie de L2 del VPH16. Los resultados se describirán a continuación en el Ejemplo (Tabla 1). Los resultados en la Tabla 1 mostraron que hay epítomos de neutralización cruzada en las regiones de los aminoácidos 18-38, 49-75 y 96-115.

15 Específicamente, los resultados mostrados en la Tabla 1 indican que hay epítomos de neutralización cruzada para VPH16, VPH18, VPH31 y VPH58 en las regiones de los aminoácidos 18-38, 56-75 y 96-115. Sin embargo, la reactividad cruzada para VPH52 no se estudió en esta etapa.

20 Aquí, en la región 96-115, el S 101° fue reemplazado por L, y el T 112° con S. Es porque el epítopo mutante que tiene L reemplazando al S 101° y al S que reemplaza T 112° es superior en la inducción del anticuerpo de reactividad cruzada para el epítopo que tiene la secuencia de aminoácidos de origen natural 96-115.

25 Los resultados en la Tabla 1 muestran que hay epítomos de neutralización cruzada para VPH16, VPH18, VPH31 y VPH58 también en la región 49-68. Sin embargo, debido a que la proteína quimérica con una región 49-75 que incluye la región 49-68 no formó una estructura de partícula y la homología de los aminoácidos L2 en la región 49-55 no fue alta en 15 tipos de VPH, como se muestra en la Figura 5, la región 49-68 no se estudió en la presente invención.

De este modo, las proteínas quiméricas se prepararon insertando el epítopo de neutralización cruzada en la región de los aminoácidos 430 a 433 de la proteína L1 y se produjeron PSV quiméricas con las proteínas quiméricas.

30 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una proteína quimérica compuesta de proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítopo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que

la región bucle para la inserción del epítopo L2 es una región de aminoácidos 430 a 433, y

el epítopo L2 tiene una secuencia de aminoácidos presentada por:

GGLGIGTGS GTGGRTGYIPL (en lo sucesivo, denominada como epítopo L2 56-75).

35 La presente memoria descriptiva divulga adicionalmente una proteína quimérica compuesta de proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítopo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que

la región bucle para la inserción del epítopo L2 es una región de aminoácidos 430 a 433, y

el epítopo L2 tiene una secuencia de aminoácidos presentada por:

LYKTCKQAGT CPPDIIPKVEG (en lo sucesivo, denominada como epítopo L2 18-38) o

40 DPVGPLDPSIVSLVEESSFI (en lo sucesivo, denominada como epítopo L2 96-115).

45 La presente invención también se refiere a una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica. El agregado está compuesto por múltiples capsómeros pentámeros, cada uno de los cuales está compuesto por cinco moléculas de proteína quimérica, y el agregado compuesto por los múltiples capsómeros pentámeros tiene preferiblemente una estructura de partícula para una mayor antigenicidad. El número de los capsómeros pentámeros que constituyen la partícula está, por ejemplo, en el intervalo de 65 a 80, preferiblemente 72, que es idéntico al número de los mismos en los virus naturales.

50 La PSV de origen natural generalmente contiene 360 moléculas de proteína L1 y, en tal caso, tiene 360 epítomos de neutralización cruzada en la partícula (Figura 6). Una proteína quimérica que tiene una secuencia de aminoácidos de 18 a 38, 56 a 75 o 96 a 115 (aminoácidos 101° y 112° reemplazados respectivamente por leucina y serina) de la proteína L2 del VPH16 insertados en la región de 430 a 433 de la proteína L1 del VPH16 se expresó en células sf9 de insecto usando un baculovirus recombinante, para producir una PSV quimérica, que se designó como Ch18/38,

Ch56/75, o Ch96/115 (101L, 112S), respectivamente (Figura 7). La micrografía electrónica en la Figura 7 muestra la estructura de partícula de las respectivas PSV quiméricas. ELISA usando estas PSV quiméricas como antígeno mostró una unión específica de anticuerpos a los epítomos insertados a la PSV quimérica (como se describe a continuación en la Tabla 2 del Ejemplo), lo que indica que los epítomos se expusieron en la superficie de PSV.

- 5 Se prepararon antisueros inmunizando conejos con estas PSV quiméricas. En ELISA usando un péptido sintético que tiene la secuencia idéntica a la del epítomo de neutralización cruzada como un antígeno, cada antisuero reaccionó específicamente con el epítomo insertado. El péptido 96/115 (101L, 112S) se agregó fácilmente, dando como resultado una disminución en la cantidad unida a la placa de ELISA, y por lo tanto, el título obtenido fue ligeramente menor (como se muestra a continuación en la Tabla 3 del Ejemplo).
- 10 El análisis de la actividad neutralizante contra los pseudovirus VPH16, VPH18, VPH31, VPH52 y VPH58 mostró que: el anticuerpo para Ch18/38 neutralizó el VPH16, VPH18 y VPH31; el anticuerpo para Ch56/75, todos los tipos del VPH; y el anticuerpo para Ch96/115 (101L, 112S), VPH16, VPH18, VPH31 y VPH58 (no se observó neutralización del VPH58 con antisueros que tienen un título bajo) (como se muestra a continuación en las Tablas 4 y 5 del Ejemplo).
- 15 Se encontró que todos los antisueros reaccionaban intensamente con VPH16, el esqueleto para la PSV quimérica, lo que indica que el epítomo de neutralización inherente a la PSV se conservaba en las PSV quiméricas. Debido a que los pseudovirus infecciosos consisten en 360 moléculas de proteína L1 y 12 moléculas de proteína L2, la proteína L2 producida en exceso en la muestra está presente como liberada en la célula. Por esa razón, el título de neutralización del anticuerpo anti-L2 se obtuvo bastante bajo.
- 20 Los experimentos con virus del papiloma animal mostraron que las vacunas de PSV y las vacunas de proteínas L2 son casi similares en eficacia, indicando que las PSV quiméricas de acuerdo con la presente invención podrían ser antígenos vacuna prácticos que inducen la generación de anticuerpos para los epítomos de neutralización cruzada.

El epítomo L2 pueden ser los aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos anterior, es decir, la representada por una de las SEQ ID Nos. 2 a 4, de los cuales uno o más aminoácidos están eliminados o sustituidos o para los cuales o se agregan uno o más aminoácidos, en los que los aminoácidos proporcionan la cápside de acuerdo con la presente especificación con capacidad para inducir un anticuerpo neutralizante cruzado similar al de la PSV que tiene el epítomo L2 original (que tiene la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID Nos. 2 a 4).

25

Por lo tanto, el epítomo L2 18-38 puede incluir los epítomos L2 mutantes de los aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos representada por LYKTCQAGTCCPDIIPKVEG (SEQ ID No. 2) de la cual uno o más aminoácidos son eliminados o sustituidos o a los que se añaden uno o más aminoácidos que proporcionan la cápside de acuerdo con la presente especificación con capacidad para inducir un anticuerpo neutralizante cruzado similar al de la PSV del VPH16 que tiene el epítomo L2 18-38. Las capacidades que inducen un anticuerpo neutralizante cruzado de las PSV del VPH16 que tienen el epítomo L2 18-38 se muestran en la Tabla 4.

30

El epítomo L2 56-75 puede incluir los epítomos L2 mutantes de los aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos representada por GGLGIGTSGTGGRGTGYIPL (SEQ ID No. 3) de los cuales uno o más aminoácidos son eliminados o sustituidos o a los cuales se agregan uno o más aminoácidos que proporcionan la cápside de acuerdo con la presente especificación con capacidad para inducir un anticuerpo neutralizante cruzado similar al de la PSV del VPH16 que tiene el epítomo L2 56-75. Las capacidades que inducen un anticuerpo neutralizante cruzado de las PSV del VPH16 que tienen el epítomo L2 56-75 se muestran en la Tabla 4.

35

40

De manera similar, el epítomo L2 96-115 puede incluir los epítomos L2 mutantes de los aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos representada por DPVGPLDPSIVSLVEESSFI (SEQ ID No. 4) de la cual uno o más aminoácidos son eliminados o sustituidos o de la cual uno o más aminoácidos son agregados lo que proporcionan la cápside de acuerdo con la presente especificación con capacidad para inducir un anticuerpo neutralizante cruzado similar al de la PSV del VPH16 que tiene el epítomo L2 96-115. Las capacidades que inducen un anticuerpo neutralizante cruzado de las PSV del VPH16 que tienen el epítomo L2 96-115 se muestran en la Tabla 4. En la presente descripción, el número de los aminoácidos más eliminados, sustituidos o agregados es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

45

El sitio en la proteína L1 de la proteína quimérica de acuerdo con la presente invención en la que se inserta el epítomo L2 está en la región de los aminoácidos 430 a 433 de la región bucle de la proteína L1. Específicamente, se inserta un epítomo L2 de 20 a 21 aminoácidos, reemplazando los cuatro aminoácidos 430 a 433 en la proteína L1. La secuencia de aminoácidos de la proteína L1 del VPH16 se muestra como la SEQ ID No. 1. Se estima que la región 426-446 que incluye los aminoácidos 430 a 433 es una región reconocible como el antígeno que se encuentra fuera de la proteína L1, desde los puntos de vista del análisis estructural de la proteína L1 del VPH16, de la distribución de epítomos de anticuerpos neutralizantes y de la posición del residuo de cisteína esencial para la formación de la cápside, etc.

50

55

El número de epítomos L2 insertados en la proteína L1 es uno para una sola proteína L1. Sin embargo, al menos dos tipos diferentes de epítomos L2 se pueden insertar en diferentes regiones bucle en una única proteína L1. Por

ejemplo, se puede insertar un péptido a excepción de los tres epítomos de neutralización cruzada en un sitio a excepción de los aminoácidos 430 a 433 de la proteína L1. Alternativamente, uno de los tres epítomos de neutralización cruzada se puede insertar en un sitio a excepción de los aminoácidos 430 a 433 de la proteína L1.

(Preparación de los péptidos que contienen el epítomo L2)

- 5 El péptido L2 (aminoácidos 18-38, 56-75 o 96-115) se puede preparar mediante un método común de Fmoc en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático de 96 columnas. El péptido, que está destinado para preparar un anticuerpo, está conectado a KLH (hemocianina de lapa californiana), y se agrega un residuo de cisteína al terminal N para la prevención del enmascaramiento de la región del péptido por la KLH.

10 La presente memoria describe el complejo de hemocianina de lapa californiana y un epítomo L2 del VPH16. El epítomo L2 tiene una secuencia de aminoácidos representada por:

LYKTCKQAGTCPPDIIPKVEG (epítomo L2 18-38),

GGLGIGTGSGTGGRGYIPL (epítomo L2 56-75) o

DPVGPLDPSIVSLVEESSFI (epítomo L2 96-115).

La hemocianina de lapa californiana y el epítomo L2 están unidas entre sí preferiblemente a través de la cisteína.

- 15 (Preparación de proteínas L1 insertadas en el epítomo L2 (proteínas quiméricas))

Se preparó un gen L1 quimérico, y el gen L1 quimérico preparado se expresó usando un vector de baculovirus, para producir una proteína L1 quimérica y una cápside quimérica. El gen L1 quimérico se prepara por PCR. Específicamente, se prepara de la siguiente manera:

(A) Se prepara un par de cebadores que tiene una región insertada en forma deseable.

- 20 (B) El conjunto de cebador compuesto por el cebador que tiene una región de inserción y el cebador 1 y el conjunto compuesto por el otro cebador que tiene una región de inserción y el cebador 2 se usan para la amplificación por PCR.

(C) Se preparan dos fragmentos de ADN amplificados que tienen un fragmento insertado en un lado. Las regiones complementarias respectivas se hibridan para la reacción de extensión.

- 25 (D) Se prepara un gen quimérico que contiene el ADN insertado.

(E) La PCR se realiza usando el ADN insertado como plantilla y los cebadores 1 y 2.

(F) Por lo tanto, el ADN que contiene el gen insertado se amplifica.

- 30 La presente invención incluye un método para producir una cápside que incluye su formación mediante un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica de acuerdo con la presente invención. Como se describió anteriormente, un gen L1 quimérico se prepara y se expresa usando un vector de baculovirus, para producir una proteína L1 quimérica. Las proteínas L1 quiméricas, una vez producidas, forman autónomamente una cápside quimérica (la cápside de acuerdo con la presente invención). La expresión de los mismos usando un vector de baculovirus se puede llevar a cabo mediante un método común, pero la condición se optimiza preferiblemente para la aceleración de la formación de la cápside quimérica autónoma.

- 35 La cápside de acuerdo con la presente invención se usa para la producción de una vacuna de cápside L1. La vacuna de la cápside L1 se puede producir, por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus.

La presente memoria descriptiva incluye mezclas de cápside que contienen dos o más tipos de cápsides de acuerdo con la presente memoria descriptiva. Los tres tipos de cápsides de acuerdo con la presente memoria descriptiva son diferentes entre sí en cuanto a la capacidad de inducir un anticuerpo neutralizante cruzado, y el uso de dos o más de estas cápsides diferentes en la capacidad de inducir un anticuerpo neutralizante cruzado en combinación proporciona ventajosamente una mayor actividad neutralizante.

- 45 La mezcla de la cápside de acuerdo con la presente invención (que es una mezcla de la cápside de acuerdo con la presente memoria) puede ser, por ejemplo, una mezcla de una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de proteína quimérica insertada en el epítomo L2 18-38 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítomo L2 56-75. Los dos tipos de cápsides pueden mezclarse, por ejemplo, en una relación en peso en el intervalo de 1:100 a 100:1. Sin embargo, la relación de mezcla de los dos tipos de cápsides no está limitada a esto, y puede modificarse de acuerdo con la inmunogenicidad deseada y la actividad neutralizante de los anticuerpos inducidos.

- 50 La mezcla de la cápside de acuerdo con la presente memoria puede ser, por ejemplo, una mezcla de una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítomo L2 18-38 y una

cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115. Los dos tipos de cápsides pueden mezclarse, por ejemplo, en una relación en peso en el intervalo de 1:100 a 100:1. Sin embargo, la relación de mezcla de los dos tipos de cápsides no está limitada a esto, y puede modificarse de acuerdo con la inmunogenicidad deseada y la actividad neutralizante de los anticuerpos inducidos.

5 La mezcla de la cápside de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, una mezcla de una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 56-75 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115. Los dos tipos de cápsides pueden mezclarse, por ejemplo, en una relación en peso en el intervalo de 1:100 a 100:1. Sin embargo, la relación de mezcla de los dos tipos de cápsides no está limitada a esto, y puede modificarse de acuerdo con la inmunogenicidad deseada y la actividad neutralizante de los anticuerpos inducidos.

10 La mezcla de la cápside de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, una mezcla de una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 18-38, una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 56-75, y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115. Los tres tipos de cápsides pueden mezclarse, por ejemplo, en una relación en peso entre los dos tipos respectivos de cápsides en el intervalo de 1:100 a 100:1. Sin embargo, la relación de mezcla de los tres tipos de cápsides no está limitada a esto, y puede modificarse de acuerdo con la inmunogenicidad y la actividad neutralizadoras deseadas de los anticuerpos inducidos.

15 La mezcla de la cápside de acuerdo con la presente invención también se usa para la producción de la vacuna de la cápside L1. El método para producir una vacuna usando la mezcla de la cápside es el mismo que el descrito anteriormente.

20 La mezcla de la cápside de acuerdo con la presente invención se usa para la producción de una vacuna de cápside L1 que puede inducir anticuerpos neutralizantes para VPH16, VPH18, VPH31, VPH52 y VPH58.

Ejemplos

25 De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de antisueros peptídicos de conejo

30 Se inmunizaron dos conejos blancos japoneses (de 2,5 kg a 3,0 kg). El antígeno utilizado fue un conjugado de un péptido químicamente preparado y KLH (hemocianina de lapa californiana). En la primera sensibilización, se administraron 0,5 mg del antígeno por vía subcutánea con adyuvante completo de Freund. Después de dos semanas desde la primera administración, se administraron 0,25 mg del antígeno por vía subcutánea con el adyuvante completo de Freund. Los conejos se sensibilizaron de manera similar (0,25 mg) adicionalmente después de 2, 4 y 6 semanas, acumulativamente cinco veces. Después de una semana de la sensibilización final, se recogió la sangre total para producir una muestra de suero. (La preparación fue realizada por Scrum Inc. bajo contrato).

35 Se inmunizó un conejo con un péptido sintético que tenía la secuencia de aminoácidos de la región superficial de L2 del VPH16 y se analizó el antisuero resultante en el experimento de neutralización que se muestra a continuación. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Los resultados mostrados en la Tabla 1 muestran que hay epítopos de neutralización cruzada en las regiones de los aminoácidos 18-38, 49-75 y 96-115.

Experimento de neutralización

40 1. Se inocularon células 293FT (adquiridas a través de Invitrogen) en una placa de cultivo celular de 96 pozos a una concentración de 10.000 células/pozo, un día antes del experimento de neutralización.

45 2. El suero se diluyó con un regulador de neutralización (medio DMEM sin rojo fenol, que contiene 10% de FCS, 1% aminoácidos no esenciales, 1% de ácido L-glutámico y HEPES 10 mM) y se mezcló con una reserva de un agente pseudovirus infeccioso, y la mezcla se dejó reaccionar a 4°C durante una hora y luego se añadió a las células 293FT inoculadas el día anterior.

3. Después de cultivar durante aproximadamente 72 horas, se recogieron 20 µL del sobrenadante, y la actividad de la fosfatasa alcalina del mismo se determinó de acuerdo con el método de Roden et al., (Véase <http://home.ccr.cancer.gov/lco/Colorimetric-SEAP.htm>).

[Tabla 1]

50 Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-péptido L2

Anticuerpo anti-péptido	VPH16	VPH18	VPH31	VPH58
-------------------------	-------	-------	-------	-------

ES 2 688 474 T3

Anticuerpo anti-péptido	VPH16	VPH18	VPH31	VPH58
anti-14/27	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	<50	<50
anti-18/28	800	50	<50	<50
	400	100	<50	<50
anti-28/42	<50	<50	<50	<50
	800	<50	<50	<50
anti-49/68	800	50	800	800
anti-56/75	400	200	200	400
	200	50	100	200
anti-61/75	400	100	<50	50
	800	200	<50	100
anti-64/81	3200	400	<50	100
	800	200	<50	50
anti-90/111	200	<50	50	<50
	200	<50	<50	<50
anti-96/115	200	<50	50	<50
	400	<50	400	200
anti-96/115 (101L, 112S)	100	<50	200	200
	100	50	100	100
anti-107/122	100	<50	<50	50
anti-131/144	<50	<50	<50	<50
	200	<50	<50	<50

Ejemplo 2

Método de preparación del antígeno de la cápside

Se expresaron 16 genes L1 y 16 L1/L2 en un sistema de baculovirus recombinante. Se preparó un virus recombinante en un sistema de expresión de baculovirus Bac-a-Bac (GIBCO-BRL Inc., Nueva York, NY) y se expresó en células Sf9 (células derivadas de *Mamestra brassicae*). El gen 16L1 se clonó en el vector pFastbac1, para producir pFastbac1/16L1. El gen 16L1/L2 se clonó en el vector dual pFastbac, para producir pFastbac dual/16L1/L2. A continuación, cada vector de pFastbac clonado se introdujo en *E. coli* DH10BAC (célula competente de eficacia máxima que contiene ADN de baculovirus y plásmido auxiliar, GIBCO BRL), para producir un báculo. El ADN del báculo se introdujo en las células sf-9 usando un reactivo de transfección Effectene (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), para producir un baculovirus recombinante que expresa la proteína de la cápside.

El baculovirus recombinante se infectó con células sf-9, y las células se recogieron después de la incubación durante 72 horas. Las células infectadas se suspendieron en una solución de NP40 al 0,5%; la mezcla se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó (9.000 rpm, 15 minutos, 4°C), para la separación de su fracción nuclear (precipitado) de la fracción citoplásmica. La fracción nuclear se resuspendió en 1,28 g/mL de solución de cloruro de cesio-PBS, se sometió a ultrasonido para destrucción de las células (en un Sonifier 250, Branson) y se ultracentrifugó (34.000 rpm, 20 horas, 20°C) usando un rotor SW50.1 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Se recogió la proteína a una densidad específica de aproximadamente 1,28 g/mL en gradiente de cloruro de cesio y se dializó frente a NaCl-PBS 0,5 M, para producir una solución de proteína de cápside.

Las secuencias de los aminoácidos 18 a 38, 56 a 75, o 96 a 115 de la proteína L2 del VPH16 (aminoácidos 101 y 112 reemplazados respectivamente con leucina y serina) se insertaron en la región de los aminoácidos 430 a 433 de

la proteína L1 del VPH16 usando el método de preparación de un antígeno de cápside, y la proteína quimérica resultante se expresó en células de insecto sf9 usando un baculovirus recombinante, para producir PSV quiméricas, que se denominaron respectivamente como Ch18/38, Ch56/75 y Ch96/115 (101L, 112S). La micrografía electrónica en la Figura 7 muestra las partículas de las PSV quiméricas. ELISA usando estas PSV quiméricas como antígeno
 5 mostró unión específica de los anticuerpos a los epítomos insertados, lo que indica que los epítomos se expusieron en la superficie de las PSV.

Método de medición del ELISA de cápside

1. Cada antígeno de la cápside se añadió en una cantidad de 1 µg/100 µL/pozo y la mezcla se dejó a 4°C durante la noche.
- 10 2. Después de la eliminación de la solución de antígeno, se añadieron 350 µL de solución de bloqueo (5% de leche desnatada en PBS), y la placa del pozo se dejó en reposo a 37°C durante 2 horas.
3. Después de la eliminación de la solución de bloqueo, cada pozo se lavó con una solución de lavado (0,05% de Teen 20/0,05% de NP40 en PBS) tres veces.
- 15 4. Se añadieron 50 µL del antisuero diluido 500 veces con la solución de bloqueo a cada pozo, y la solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora.
5. Después de la extracción de la muestra de suero, el pozo se lavó nueve veces, y se añadió un anticuerpo anti IgG de conejo unido a HRP diluido 2.000 veces a cada pozo en una cantidad de 50 µL. La solución se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos, y el pozo se lavó con la solución de lavado seis veces después de la eliminación de la solución.
- 20 6. Se añadieron a la misma 50 µL de una solución de sustrato (24 mg de o-fenilendiamina disuelta en 12 mL de una solución reguladora de citrato-fosfato a pH 5,0, que contiene 1,2 µL de H₂O₂), y, después del desarrollo del color durante 15 minutos, se determinó la intensidad de la luz a una longitud de onda de 450 nm usando un lector Immuno.

Usando el método preparativo para el antígeno de la cápside (Ejemplo 2), se expresaron las proteínas quiméricas, que tienen cada una las secuencias de los aminoácidos 18 a 38, 56 a 75 o 96 a 115 (los aminoácidos 101 y 112 reemplazados respectivamente con leucina y serina) de la proteína L2 del VPH16 insertada en la región de los aminoácidos 430 a 433 de la proteína L1 del VPH16 en células sf9 de insecto usando un baculovirus recombinante, para producir PSV quiméricas, que se denominaron respectivamente como Ch18/38, Ch56/75 y Ch96/115 (101L, 112S). Las micrografías electrónicas en la Figura 7 muestran las partículas de las PSV quiméricas. ELISA usando estas PSV quiméricas como antígeno mostró unión específica de los anticuerpos a los epítomos insertados a las PSV quiméricas, lo que indica que los epítomos se expusieron en la superficie de las PSV. Los resultados se resumen en la Tabla 2.
 25
 30

Tabla 2

Unión de anticuerpos anti-péptido L2 para PSV quiméricas

antígeno antisuero	PSV L1 del HPV16	Ch18/38	Ch56/75	Ch96/115 (101L, 112S)
anti-p18/38	0,042	0,872	0,037	0,042
anti-P56/75	0,041	0,039	0,803	0,041
anti-P96/115 101L, 112S	0,040	0,043	0,045	0,821

(absorbancia en ELISA con suero diluido de 1 a 500 para los antígenos peptídicos y 1:2.000 para PSV L1 del VPH16)

35 Se prepararon antisueros inmunizando conejos con estas PSV quiméricas. Los antisueros se prepararon de manera similar al Ejemplo 1. (Sin embargo, la dosificación de la cápside quimérica fue 50 µg, y el adyuvante utilizado fue TiterMax (fabricado por TiterMax, EE.UU.). En ELISA utilizando un péptido sintético que tiene la secuencia idéntica con el del epítomo de neutralización cruzada como antígeno, cada antisuero reaccionó específicamente con el epítomo insertado. Los resultados se resumen en la Tabla 3. El péptido 96/115 (101L, 112S) se agregó fácilmente,
 40

dando como resultado una disminución en la cantidad unida a la placa de ELISA, y por lo tanto, el título obtenido fue ligeramente menor que aquellos obtenidos con otros dos péptidos.

Tabla 3

Unión de anticuerpos anti-PSV quiméricos (suero) al péptido L2

antígeno		Péptido			
		HPV16VPL	P18/38	P56/75	P96/115 (101L, 112S)
suero	anti-ch1838	#1 0,711	0,543	0,0441	0,042
		#2 0,633	0,402	0,039	0,039
anti-ch56/75		#1 0,844	0,040	0,965	0,039
		#2 0,354	0,037	0,135	0,042
		#3 0,923	0,043	1,034	0,045
		#4 0,854	0,042	0,972	0,041
Anti-Ch96115 (101L, 112S)		#1 0,765	0,041	0,045	0,042(0,170)*
		#2 0,590	0,043	0,042	0,380(0,158)*

Absorbancia en ELISA con suero diluido de 1 a 500 para los antígenos peptídicos y de 1:2.000 para PSV del VPH6

*indica el segundo resultado de la prueba.
El paréntesis indica el primer resultado de la prueba.

5

Ejemplo 3

Preparación del pseudovirus infeccioso

1. Un plásmido que expresa la proteína L1 del VPH16, un plásmido que expresa la proteína L2 del VPH16 y un plásmido que expresa la fosfatasa alcalina secretora se transfectaron a células 293TT usando Fugene HD. Las células se recogieron 72 horas después de la transfección.
2. Las células recogidas se suspendieron en un regulador detergente (Brij58 al 0,5%, Benzonasal al 0,5% y exonucleasa C segura para el plásmido dependiente de ATP al 1% en D-PBS (CaCl₂: 1 mM, MgCl₂: 10 mM)) y se dejó la suspensión aún a 37°C durante la noche.
3. Luego, la suspensión se dejó quieta a 4°C durante 10 minutos, y se añadió NaCl 5 M a la misma hasta una concentración final de NaCl de 850 mM.
4. La suspensión celular se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.
5. El sobrenadante recogido se extendió sobre una solución Optiprep (fabricada por AXIS-SHIELD PoC AS) al 27%, 33% o 39% (diluido con PBS) y la solución se ultracentrifugó a 50.000 rpm durante 3 horas a 16°C.
6. Después de la ultracentrifugación, se recogió cada fracción del fondo en una cantidad de aproximadamente 300 µL, y la fracción que tenía el título más alto se usó como la fracción de pseudovirus infeccioso en el experimento de infección.

Experimento de neutralización

1. Se inocularon células 293FT (adquiridas a través de Invitrogen) en una placa de cultivo celular de 96 pozos a una concentración de 10.000 células/pozo, un día antes del experimento de neutralización.
2. El suero se diluyó con un regulador de neutralización (medio DMEM sin rojo fenol, que contiene 10% de FCS, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de ácido L-glutámico y HEPES 10 mM) y se mezcló con una reserva de un

25

agente pseudovirus infeccioso, y la mezcla se dejó reaccionar a 4°C durante una hora y luego se añadió a las células 293FT inoculadas el día anterior.

3. Después de cultivar durante aproximadamente 72 horas, se recogieron 20 µL del sobrenadante, y la actividad de la fosfatasa alcalina del mismo se determinó de acuerdo con el método de Roden et al. (Véase <http://home.ccr.cancer.gov/lco/Colorimetric-SEAP.htm>).

Las actividades neutralizantes de los anticuerpos anti-PSV quiméricos contra los pseudovirus VPH16, VPH18, VPH31, VPH35, VPH52 y VPH58 se estudiaron usando el método anterior. Los resultados se resumen en la Tabla 4. El anticuerpo para Ch18/38 neutralizó los pseudovirus VPH16, VPH18 y VPH31. El anticuerpo para Ch56/75 neutralizó los seis tipos de pseudovirus. El anticuerpo para Ch96/115 (101L, 112S) neutralizó los pseudovirus VPH16, VPH18, VPH31 y VPH58 (no se observó la neutralización de los antisueros de bajo título con el pseudovirus VPH58). La PSV anti-VPH16 para comparación neutralizó los pseudovirus VPH16, VPH31 y VPH35.

[Tabla 4]

Neutralización de pseudovirus de HPV16, HPV18, HPV31, HPV52 y HPV58 de neutralización del suero VLP anti-quimérico

		Título de neutralización					
suero		HPV16	HPV18	HPV31	HPV35	HPV52	HPV58
anti-ch18/38	#1	204.800	400	3.200	NT	<50	<50
	#2	102.400	200	50	NT	<50	<50
anti-ch56/75	#1	51.200	200	3.200	6.400	6.400	1.600
	#2	1.600	<50	50	400	400	50
	#3	51.200	800	50	100	50	400
	#4	409.600	100	800	50	6.400	400
	#5	204.800	100	3.200	NT	3.200	800
Anti-Ch96/115 (101L, 112S)	#1	204.800	100	800	NT	<50	50
	#2	102.400	50	50	NT	<50	<50
Anti-HPV16VLP		204.800	<50	800	50	<50	<50

Además, se estudiaron las actividades neutralizantes de las mezclas de anticuerpos (relación en peso: 1:1) a los pseudovirus VPH16, VPH18, VPH31, VPH52 y VPH58. Los resultados se resumen en la Tabla 5. La mezcla de los anticuerpos para Ch18/38 y Ch56/75 y la mezcla de los anticuerpos para Ch56/75 y Ch96/115 (101L, 112S) neutralizaron los cinco tipos de pseudovirus. La mezcla de los anticuerpos para Ch18/38 y Ch96/115 (101L, 112S) neutralizó los pseudovirus VPH16, VPH18, VPH31 y VPH58.

Tabla 5

Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-PSV quiméricos

		Título de neutralización				
Mezcla de antisuero		HPV16	HPV18	HPV31	HPV52	HPV58
anti-ch18/38 #1						
anti-ch56/75 #1		204.800	800	3.200	3.200	400
anti-ch56/75 #1						
Anti-Ch96/115 (101L, 112S) #1		204.800	200	3.200	3.200	400

anti-ch18/38 #1					
Anti-Ch96/115 (101L, 112S) #1	204.800	200	1.600	<50	50

Se puede hacer referencia a la siguiente literatura, al realizar los experimentos en los Ejemplos de la presente descripción.

Literatura de referencia

- 5 1) Matsumoto. K, et al.: Antibodies to human papillomavirus 16, 18, 58, and 6b major capsid proteins among Japanese females. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 369-375, 1997.
- 2) Xiaojiang S. Chen, et al.: Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus
16. *Mol. Cell.*, 5, 557-567, 2000.
- 10 3) Jean-Remy Sadeyen, et al.: Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope. *Virology.*, 309, 32-40, 2003.
- 4) Ishii. Y, et al.: Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1 capsids. *Virology.*, 308, 128-136, 2003.

15 Aplicabilidad industrial

La cápside de acuerdo con la presente invención es un antígeno de la PSV del VPH16 que tiene un epítipo común de tipo L2 adicional. La cápside contiene 360 nuevos epítipos adicionales en una partícula, al tiempo que conserva su antigenicidad de las vacunas actuales. Después de las pruebas de verificación de la actividad preventiva de la infección con el anticuerpo anti-L2, puede usarse como un antígeno vacuna que posiblemente pueda prevenir la infección de todos los VPH cancerígenos. Posiblemente sea un antígeno vacuna contra el VPH de segunda generación que puede prevenir la infección de enfermedades relacionadas con el VPH de alto riesgo, como el cáncer de cuello uterino, que representa alrededor del 11% de los tumores malignos femeninos del mundo (450 mil pacientes).

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es una ilustración para explicar partículas de virus del papiloma humano. Genoma: ADN circular de doble cadena, Partícula: icosaédrica regular (55 nm), diversos mamíferos se infectan persistentemente con virus del papiloma específicos de cada especie. Hay 100 o más tipos de VPH, y la infección de 15 tipos de ellos (en grupos de alto riesgo) causa la aparición de cáncer de cuello uterino.

30 La Figura 2 son vistas que explican la partícula similar a virus (PSV). Prácticamente no hay una línea celular cultivada que permita la proliferación del VPH. La expresión de la proteína L1 por ejemplo con un baculovirus recombinante da como resultado el ensamblaje de la misma en el núcleo, formando PSV. Las vacunas de primera generación contienen una PSV de tipo 16 o 18 como antígeno. La antigenicidad de las PSV es del tipo altamente específica.

La Figura 3 es un dibujo que explica el método preparativo para un pseudovirus infeccioso.

35 La Figura 4 es un dibujo que explica la región superficial de L2. La secuencia de aminoácidos en la región superficial de L2 del VPH cancerígeno, altamente homóloga en las secuencias de aminoácidos, desempeña un papel esencial en la infectividad de los VPH.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la región superficial de L2 del VPH16.

40 La Figura 6 es un dibujo que explica la PSV quimérica preparada insertando un epítipo de neutralización cruzada en la proteína L1. La PSV quimérica tiene 360 epítipos L2 de neutralización cruzada. La antigenicidad y la estabilidad de la PSV se verificaron.

La Figura 7 incluye dibujos que explican PSV quiméricas, Ch18/38, Ch56/75 y Ch96/115 (101L, 112S) (que incluyen secuencias de aminoácidos) y fotografías de las partículas. La PSV de tipo silvestre L1 del genotipo 16 es una fotografía de PSV no quimérica.

45 <110> JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION

ES 2 688 474 T3

<120> Antígeno vacuna que puede inducir un anticuerpo neutralizante cruzado para virus de papiloma humano de alto riesgo

<130> 51.274 K

<160> 4

5 <210> 1

<211> 505

<212> PRT

<213> proteína L1 del VPH genotipo 16

<400> 1

```

Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val
      5                               10                    15

Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn
      20                               25                    30\201

Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro
      35                               40                    45

Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys
      50                               55                    60

Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro
      65                               70                    75                    80

Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln
      85                               90                    95

Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro
      100                              105                    110

Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp
      115                              120                    125

Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg
      130                              135                    140

Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly
      145                              150                    155                    160

Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr
      165                              170                    175

Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn
      180                              185                    190

Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met
      195                              200                    205

Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile
      210                              215                    220

Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu
      225                              230                    235                    240

Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe
      245                              250                    255

Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Glu Asn Val Pro

```

10

ES 2 688 474 T3

```

                260                      265                      270
Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser
    275                      280                      285

Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala
    290                      295                      300

Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn
    305                      310                      315                      320

Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr
    325                      330                      335

Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu
    340                      345                      350

Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu
    355                      360                      365

Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr
    370                      375                      380

Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu
    385                      390                      395                      400

Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp
    405                      410                      415

Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr
    420                      425                      430

Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu
    435                      440                      445

Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu
    450                      455                      460

Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe
    465                      470                      475                      480

Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr
    485                      490                      495

Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu
    500                      505

```

<210> 2

5 <211> 21

<212> PRT

<213> epítipo L2 18-38 del VPH genotipo 16

<400> 2

```

Leu Tyr Lys Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr
                    5                      10
Cys Pro Pro Asp Ile Ile Pro Lys Val Glu Gly
                    15                      20

```

10 <210> 3

REIVINDICACIONES

1. Una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de proteína quimérica compuesta por la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que
- 5 la región para la inserción del epítipo L2 es una región de aminoácidos 430 a 433 y el epítipo L2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por:
GGLGIGTGSSTGGRTGYIPL (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 56-75).
2. La cápside de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agregado es un agregado formado por el ensamblaje de múltiples capsómeros pentámeros, cada uno de los cuales está compuesto por cinco moléculas de proteína quiméricas.
- 10 3. La cápside de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agregado formado por el ensamblaje de múltiples capsómeros pentámeros tiene una estructura de partícula.
4. La cápside de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el número de capsómeros pentámeros que constituyen el agregado está en el intervalo de 65 a 80.
- 15 5. La cápside de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el número de capsómeros pentámeros que constituyen el agregado es 72.
6. La cápside de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en la producción de una vacuna de cápside L1.
- 20 7. Una mezcla de la cápside que comprende dos o más tipos de cápsides, en la que los dos o más tipos de cápsides comprenden una cápside de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica compuesta por la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que
- 25 la región para la inserción del epítipo L2 es una región de aminoácidos 430 a 433 y el epítipo L2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por:
LYKTCKQAGTCCPDIIIPKVEG (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 18-38) o
DPVGPLDPSIVSLVEESSFI (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 96-115).
- 30 8. La mezcla de la cápside de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 18-38 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 56-75.
9. La mezcla de la cápside de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 18-38 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115.
- 35 10. La mezcla de la cápside de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 de 56-75 y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115.
- 40 11. La mezcla de la cápside de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 18-38, una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 56-75, y una cápside que es un agregado formado por el ensamblaje de la proteína quimérica insertada en el epítipo L2 96-115.
12. La mezcla de la cápside de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para uso en la producción de una vacuna de cápside L1.
- 45 13. La mezcla de la cápside de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para uso en la producción de una vacuna de cápside L1 que puede inducir los anticuerpos neutralizantes al menos a los virus del papiloma humano 16, 18, 31, 52 y 58.

14. Una proteína quimérica compuesta por la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) genotipo 16 y un epítipo L2 del VPH16 insertado en la región bucle de la proteína L1 del VPH16, en la que la región bucle para la inserción del epítipo L2 es una región de aminoácidos 430 a 433, y

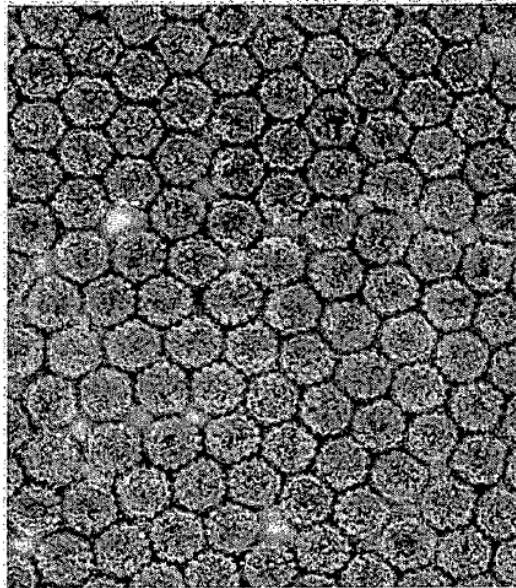
el epítipo L2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por:

5 GGLGIGTGSGTGGRTGYIPL (en lo sucesivo, denominada como epítipo L2 56-75).

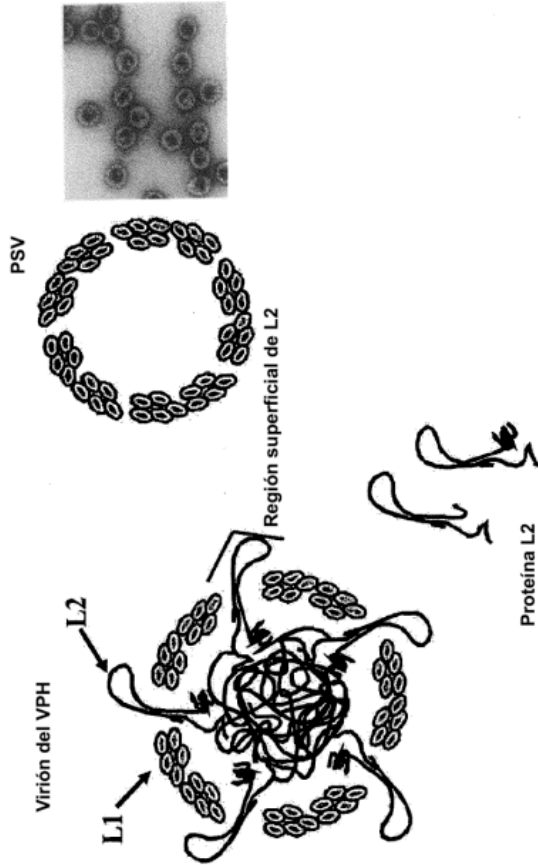
15. Un método de producción de la cápside de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cápside se forma mediante el ensamblaje de la proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 14.

10 16. Un método para producir la mezcla de la cápside de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, que comprende preparar dos o más tipos de cápsides mediante el método de acuerdo con la reivindicación 15 y mezclar las cápsides resultantes.

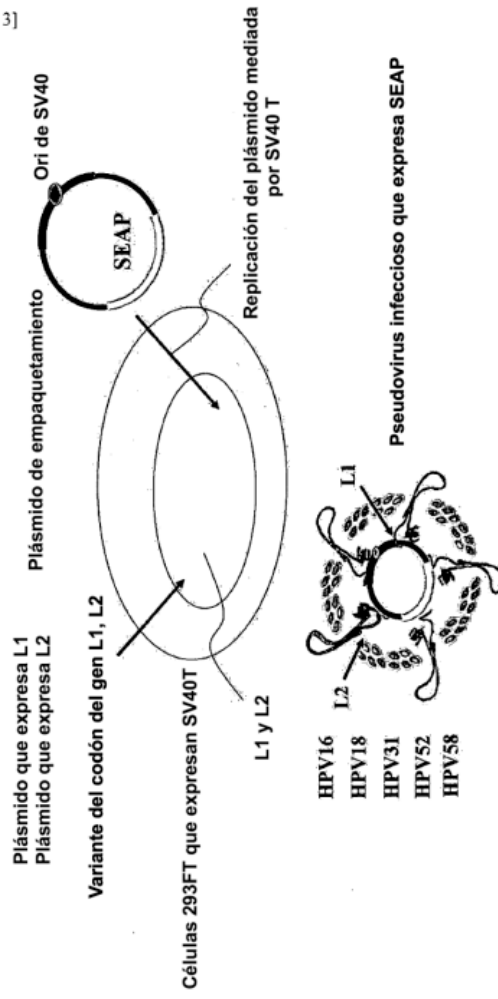
[Fig 1]



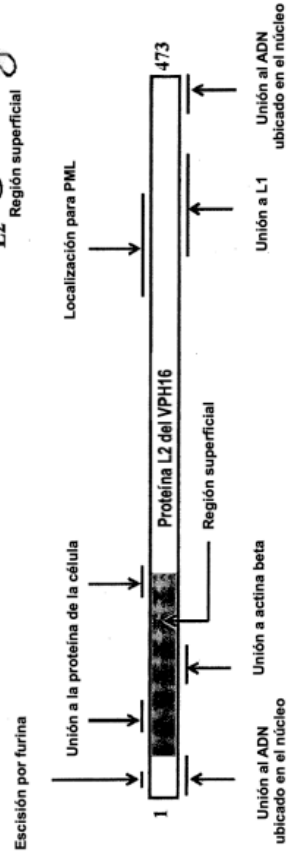
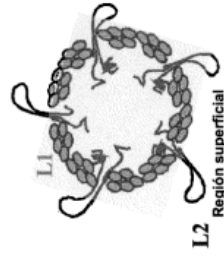
[Fig 2]



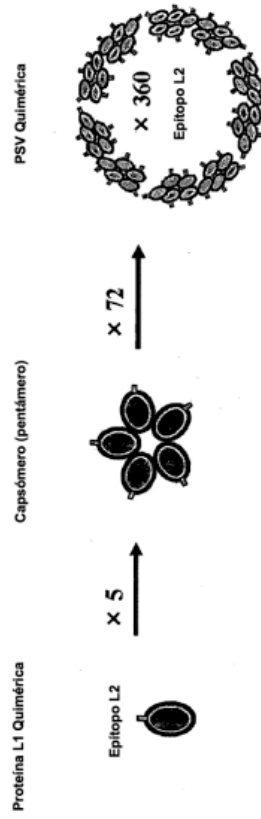
[Fig 3]



[Fig 4]



[Fig 6]



[Fig 7]

