

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 643**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2012 PCT/EP2012/003273**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13017272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2012 E 12753905 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2739725**

54 Título: **Procedimiento para purificar partículas similares a virus (VLP)**

30 Prioridad:

02.08.2011 EP 11176295

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2020

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCE INKUBATOR BETRIEBS GMBH &
CO. KG (100.0%)
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn, DE**

72 Inventor/es:

**DEMINA, VICTORIA y
MANNINGA, HEIKO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 769 643 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

Procedimiento para purificar partículas similares a virus (VLP)

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar composiciones que contienen VLP y composiciones que contienen VLP de alta pureza y a su uso en procedimientos de diagnóstico o terapéuticos.

- 5 En el desarrollo de procedimientos de diagnóstico o terapéuticos específicos, el uso de sistemas de transferencia (delivery systems) que permiten una transferencia, específica para células tanto como es posible, de sustancias tales como ácidos nucleicos, marcadores o sustancias activas es de gran importancia. para esta transferencia específica para células se ha desarrollado, entre otros, un sistema a base de "partículas similares" a virus (VLP por virus like
10 particles) (publicaciones WO 97/19174; EP 1 270 586 B1). La base de este sistema es la propiedad de las VLPs, por ejemplo, de poder empacar sustancias activas o ácidos nucleicos y luego insertarlos específicamente en determinadas células.

- Las VLPs se pueden preparar, por ejemplo, mediante la expresión recombinante de la proteína estructural principal VP1 del poliomavirus humano JCV (VP1-VLP). A diferencia de la expresión de VP1 de otros virus de polioma, Las VP1-VLP se secretan en el sobrenadante de los cultivos de células anfitrionas. Ya se han desarrollado varios
15 procedimientos para purificar el VP1-VLP del sobrenadante del cultivo celular. Sin embargo, todos estos no son adecuados para preparar VLP a escala comercial (gran escala). Esto es válido principalmente si el procedimiento de preparación debe ser certificable por GMP, ya que la pureza de la VLP está sujeta a requisitos particularmente altos.

- Por ejemplo, Goldmann et al. (J. Virol., 1999, 73: 4465-4469) describen la purificación de VP1-VLP expresada en células de insecto mediante centrifugación por densidad con una solución de sacarosa al 40% seguida de una
20 centrifugación por densidad con sacarosa al 40% y metrizamida (2-((3-(acetilamino)-5-[acetil(metil)amino]-2,4,6-tri-yodobenzoilo)amino)-2-desoxi-D-glucopiranososa al 50% . Este procedimiento no solo es inadecuado para la producción a gran escala. Las proteínas VP1 así proporcionadas también están contaminadas con fragmentos de VP1 de 38 y 40 kDa.

- Para la purificación de VLP recombinante a partir de células de E. coli lisadas, Pushko et al. (Protein Engineering, 1993, 6(8): 883-891) usan una precipitación con sulfato de amonio seguida de cromatografía de permeación en gel usando una columna Sephadex G25 y una columna G100.

- Por la publicación WO 92/13081 A1 se conoce un procedimiento de purificación para el aislamiento de VLP derivada de MS-2 por precipitación fraccionada con sulfato de amonio y posterior precipitación por puntos isoeléctricos, centrifugación por densidad de sacarosa y cromatografía de permeación en gel.

- 30 En la publicación WO 2006/136566 A9 se describe la purificación de VLP recombinante expresada de modo bacteriano mediante cromatografía de intercambio aniónico seguida de una columna de hidroxilapatita y una cromatografía de permeación en gel opcional.

- Citkowicz et al. (Anal. Biochem., 2008, 376(2): 163-172) describen un procedimiento de purificación de VLP en el que las VLP se separan primero de los residuos celulares mediante centrifugación y luego se precipita el sobrenadante que contiene VP1-VLP usando PEG. Luego se filtra por medio de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm. Las VLP se recogen en el filtrado y se purifican adicionalmente.

- Los procedimientos conocidos del estado de la técnica no son lo suficientemente adecuados para preparar la VLP fuera de la escala del laboratorio, ya que son muy complejos, no permiten la ampliación a un procedimiento industrial y/o no cumplen con los altos requisitos de un procedimiento conforme con GMP. Esto último es válido sobre todo debido a las impurezas que se pueden incluir en las VLP.

- Por lo tanto, la invención se basa en el objetivo de proporcionar un procedimiento de preparación de VLP que al menos reduzca o incluso evite en gran medida una desventaja de los procedimientos de preparación conocidos.

- Este objetivo se consigue según la invención mediante el procedimiento según la reivindicación principal. Las formas de realización ventajosas son objeto de las reivindicaciones dependientes correspondientes. También se reivindican composiciones de VLP de determinada pureza; así como proteínas ventajosas de VP1.

- La presente invención proporciona un procedimiento para purificar eficazmente VLP. El procedimiento tiene la ventaja particular de que se permite la preparación a gran escala, que también cumple con los altos requisitos para un procedimiento de GMP ("buenas prácticas de fabricación").

- 50 El procedimiento de acuerdo con la invención para la purificación de VLP se caracteriza porque una composición que contiene VLP se filtra a través de un medio filtrante, en particular una membrana; el medio filtrante tiene un límite de exclusión (corte de peso molecular (MWCO) de más de 30 kDa hasta 1500 kDa y como composición que contiene VLP se usa el sobrenadante de cultivo celular de células que expresan VLP. Los inventores han descubierto que, con una etapa así al comienzo de un procedimiento posterior que se lleva a cabo en todo caso

después de al menos una etapa de cromatografía del estado de la técnica, es posible una purificación simple y eficiente de las VLP.

Cuando la VLP se filtra a través del medio filtrante utilizado según la invención, los posibles contaminantes pasan a través del medio filtrante y se acumulan en el filtrado, mientras que las VLP de alto peso molecular permanecen en el retenido en forma purificada. Este procedimiento de una sola etapa permite, por lo tanto, una separación sencilla de las VLP de las impurezas presentes en la composición.

Dependiendo del procedimiento, se puede lograr una concentración de la composición que contiene VLP en esta etapa de purificación, ya que el volumen líquido del retenido disminuye naturalmente durante la filtración y aumenta la fracción relativa de VLP en el retenido. La concentración es una ventaja en muchos procedimientos de purificación, porque las etapas posteriores como, por ejemplo, una purificación por cromatografía en columna, se pueden llevar a cabo de manera más eficiente y rentable.

Además, esta etapa de purificación se usa para cambiar las condiciones de solución de la composición que contiene VLP, por ejemplo, intercambiando el regulador de pH (denominado, re-amortiguación). Este procedimiento también se conoce como diafiltración.

El procedimiento de purificación de acuerdo con la invención también tiene al menos una de las siguientes ventajas:

- es un procedimiento de purificación suave que deja las VLP en su forma nativa, tanto como es posible, lo cual es esencial para su actividad. Por lo contrario, en procedimientos del estado de la técnica se dan parcialmente cambios en la superficie de VLP (por ejemplo, con respecto a los cambios en la carga), que pueden afectar negativamente el uso posterior o el tratamiento de las VLP.
- Se puede evitar el uso de disolventes orgánicos, que de lo contrario pueden traer consigo el riesgo de desnaturalización de proteínas.
- El medio iónico y el pH de la composición que contiene VLP se pueden mantener si es necesario.
- La etapa de filtración de acuerdo con la invención es rápida y económica. También es eficiente y puede usarse para purificación, concentración y/o amortiguación del pH al mismo tiempo.
- Se puede llevar a cabo a bajas temperaturas como, por ejemplo, en una habitación fría.

Sin embargo, la ventaja particular del procedimiento de acuerdo con la invención es que se puede lograr una mejora significativa en la pureza de las VLP en una composición altamente compleja y altamente contaminada en una sola etapa. Esto también se aplica a composiciones tan complejas como un sobrenadante de cultivo celular. Por lo tanto, la pureza de la composición que contiene VLP después de la filtración de acuerdo con la invención puede ser de al menos 70 %, ventajosamente de al menos 75% o de al menos 80%. La pureza se puede aumentar mediante procedimientos de purificación adicionales.

Definiciones

A menos que se especifique lo contrario, los términos utilizados en la descripción y las reivindicaciones tienen los significados que se definen a continuación:

el término "partículas similares a virus (VLP)" en el sentido de la invención se refiere a una estructura en forma de partículas en la que varias proteínas están presentes en forma agregada, en cuyo caso preferiblemente encierran un espacio vacío. Al menos una parte de las proteínas formadoras de estructura es idéntica a o derivada de proteínas estructurales virales (proteínas de la cápside), en particular de virus de la familia Papoviridae. Esto incluye la familia Papillomaviridae y la familia Polyomaviridae. Las VLP también pueden provenir de otras familias de virus, como, por ejemplo, la familia de Parvoviridae, Flavoviridae y Retroviridae. Las VLP según la invención se componen a partir de la proteína estructural VP1 del virus JC humano.

Se forma preferiblemente una VLP de 60, 72, 120, 180, 240, 300, 360 y más de 360 proteínas estructurales virales y puede tener una estructura tubular o esférica. Una VLP que consta de 360 proteínas estructurales generalmente está compuesta por 72 pentámeros, cada uno de los cuales está formado por cinco proteínas estructurales monoméricas. Las proteínas estructurales y los pentámeros pueden agregarse por unión no covalente o covalente de las proteínas. En el caso de un enlace covalente, se prefiere la formación de puentes disulfuro.

Una VLP puede construirse a partir de una multiplicidad de una sola proteína estructural, o puede comprender diferentes proteínas estructurales. Se prefiere la presencia de una sola proteína estructural, concretamente VP1.

Se divulgan proteínas estructurales de las VLP, en particular la VP1 (pero también la VP2 y/o la VP3) que son idénticas a o derivadas de las proteínas estructurales, por ejemplo, de los siguientes virus de la familia de los Polyomaviridae: poliomavirus de cercopithecus (mono verde) (AGMPyV), poliomavirus de babuino 2 (BPyV-2), poliomavirus Humano 1 (BK Virus, BKV o BKPyV), poliomavirus Humano 2 (JC Virus, JCV o JCPyV), poliomavirus bovino (BPyV), poliomavirus de periquito (poliomavirus de enfermedad de polluelo, BFPyV), poliomavirus de hámster

(HaPyV), virus neumotrópico de murino (MPtV), poliomavirus de murino (MPyV), poliomavirus de conejo (virus vacuolado de riñón de conejo Rabbit kidney vacuolating virus, RKV), virus de simio 12 (SV-12), virus de simio 40 (SV-40), poliomavirus de cuervo, poliomavirus hemorrágico de ganso (GHPV), poliomavirus de células de Merkel, poliomavirus de chimpancé, poliomavirus de pinzón y poliomavirus KI (KIV).

- 5 Sin embargo, las VLP también pueden corresponder a o derivarse de las proteínas estructurales de los virus, preferiblemente el L1 (pero también el L2) de la familia Papillomaviridae, por ejemplo de los siguientes géneros de virus: alfa-papilomavirus, beta-papilomavirus, gamma-papilomavirus, delta-papilomavirus, épsilon-papilomavirus, zeta-papilomavirus, etapapilomavirus, thetapapilomavirus, iotapapilomavirus, kappapapilomavirus, lambdapapilomavirus, mupapilomavirus, nupapilomavirus, xipapilomavirus, omikronpapilomavirus, pipapilomavirus, papilomavirus de *trichosurus vulpécula* (zarigüeya australiana) y papilomavirus de didélido.

10 La VLP de la invención también puede tener una o más proteínas heterólogas adicionales en la cápside: es decir, proteínas que no son idénticas o similares a una proteína de un virus de la familia Papoviridae. En principio, todas las proteínas que pueden incorporarse a la cápside o que se unen a la cápside y que no perjudican significativamente el ensamblaje de la VLP son adecuadas como proteínas heterólogas.

- 15 Una "composición que contiene VLP" es cualquier composición que contiene VLP, preferiblemente un líquido. El término "líquido", a diferencia de un sólido, incluye todas las composiciones fluidas, incluyendo líquidos altamente viscosos, aceitosos o bituminosos. La composición puede ser monofásica o multifásica. Las VLP pueden estar disueltas, pero opcionalmente también pueden presentarse en forma de partículas dispersas o suspendidas con la formación de agregados.

- 20 Según la invención, el término "medio filtrante" se refiere a cualquier medio que permita la separación de sólido/líquido. Preferiblemente tiene la forma de una matriz porosa que separa al menos dos compartimentos y permite la etapa de sustancias individuales de un compartimento a al menos un segundo compartimento. Cualquier procedimiento que se lleve a cabo utilizando un medio filtrante debe entenderse como "filtración" dentro del alcance de la presente invención.

- 25 Una "membrana" en el sentido de la invención es una estructura que generalmente es extendida superficialmente y tiene poros. La membrana es preferiblemente flexible y consiste en un polímero o una mezcla de polímeros. Según la invención, el polímero utilizado es, en particular, polietersulfona o celulosa (en particular celulosa regenerada).

Según la invención, el "límite de exclusión" (también "límite de separación") indica la tasa de retención de filtración. Por lo general, se relaciona con la masa molar y se indica en daltons (NMWC, inglés: corte de peso molecular nominal, también MWCO, corte de peso molecular). Se define como la masa molecular mínima de una molécula retenida por el medio filtrante.

- 30 Un "pentámero" en el contexto de la invención es una estructura que está formada por cinco subunidades de polipéptidos. La unión entre las subunidades de polipéptidos individuales puede tener lugar por unión no covalente o covalente. Las cinco subunidades a menudo forman una estructura anular con simetría pentagonal. Como regla general, cada subunidad interactúa con dos subunidades vecinas.

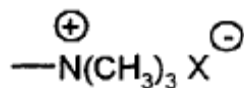
- 35 En el contexto de la invención, "disociación" significa el procedimiento en el cual la integridad de la VLP se ve afectada de tal manera que el espacio preferiblemente encerrado por la VLP entra en contacto con el medio externo que rodea la VLP y/o las proteínas de la cápside se separan de la VLP. Por lo general, esto se logra mediante la escisión de algunos polipéptidos o proteínas que forman la VLP. Aquí, la VLP también puede descomponerse enteramente en sus subunidades como, por ejemplo, los pentámeros VP1 o L1.

Según la invención, una "reasociación" es una restauración parcial o completa de una VLP a partir de una disociación de VLP previa.

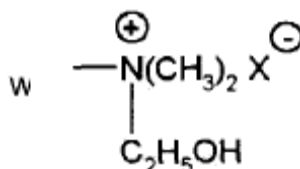
- 45 La abreviatura "GMP" es el nombre corto de "Reglamento de buenas prácticas de fabricación". Estas reglas básicas de la Organización Mundial de la Salud compilan las reglas y medidas reconocidas para la fabricación de productos medicinales y alimenticios, que garantizan una producción segura para el consumidor (paciente o consumidor) con base en el estado actual de la técnica. Además del equipo adecuado para el personal, las habitaciones y las máquinas, las reglas de GMP requieren un sistema de medidas de seguridad que se extienda desde la inspección entrante hasta la inspección saliente durante todo el procedimiento de fabricación.

- 50 Las "impurezas" deben entenderse como aquellos componentes de la composición que contiene VLP que no son deseables en la composición y, por lo tanto, deben agotarse tanto como sea posible. Estas pueden ser, por ejemplo, sales, compuestos de bajo peso molecular o también macromoleculares. La extracción de las impurezas conduce a un aumento en la pureza de la sustancia deseada, es decir a un aumento en el contenido material de la sustancia deseada (aquí VLP) con respecto a toda la mezcla de sustancias. Los términos "intercambiador de aniones" o "matriz de intercambiador de aniones" son sinónimos y ambos se refieren a sustancias naturales o artificiales que pueden unir aniones y pueden intercambiarlos por aniones de un medio circundante. Un intercambiador de aniones transporta iones positivos e intercambia contraiones cargados negativamente.

Los "intercambiadores de aniones fuertes" en el sentido de la invención llevan grupos de amonio cuaternario de tipo I:



o del tipo II:



5

que se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, cloruro, sulfato, bromuro, yoduro, fluoruro, sulfuro, hidrosulfato, sulfuro de hidrógeno, fosfato, difosfato, monofosfato, carbonato, bicarbonato (hidrocarbonato), citrato, tartrato y ftalato. Una columna disponible comercialmente con una fuerte matriz de intercambio aniónico es, por ejemplo, la columna Mono Q de GE Healthcare (Munich, RFA).

10 Los "intercambiadores de aniones débiles" en el sentido de la invención portan grupos de amina terciaria o secundaria como grupos funcionales, tales como, por ejemplo, grupos dietilaminoetilo (DEAE). Una matriz de intercambio aniónico DEAE débil disponible comercialmente es, por ejemplo, el "adsorbente de membrana Sartobind Q" de Sartorius (Göttingen, RFA).

15 El término "ultrafiltración" se refiere a un procedimiento en el que un líquido (típicamente bajo presión) se pone en contacto con un medio filtrante, en particular una membrana semipermeable. La presión se puede aplicar ejerciendo una presión sobre el líquido ubicado sobre la membrana del filtro o centrifugando la unidad de filtro. Alternativamente, la etapa de la solución puede acelerarse aplicando una presión negativa debajo de la membrana del filtro. La membrana contiene poros de un tamaño definido para que las moléculas o complejos que son lo suficientemente pequeños como para ser porosos pasen a través de la membrana hacia el lado opuesto, mientras que permanecen las moléculas o complejos que son demasiado grandes para pasar a través de los poros en el lado de carga de la membrana. Las membranas de ultrafiltración generalmente consisten en polímeros o mezclas de polímeros y están diseñadas para un límite de separación de peso molecular específico (límite de exclusión).

20 El término "diafiltración" se refiere a una forma de ultrafiltración que combina las propiedades de la diálisis con las de la ultrafiltración. La adición de un disolvente al retenido de filtración permite cambiar o diluir el disolvente original (por ejemplo, "re-amortiguación").

25 Un "sobrenadante de cultivo celular" en el contexto de la invención es esa parte del cultivo celular que proviene de un cultivo celular y que está esencialmente libre de células que secretan VLP. En una forma de realización preferida de la invención, el sobrenadante de cultivo celular contiene menos del 5%, preferiblemente menos del 2%, en particular menos del 1% de células secretoras de VLP. El sobrenadante del cultivo celular generalmente contiene una alta proporción de contaminantes (por, ejemplo, restos celulares, proteínas o fragmentos de los mismos). El sobrenadante del cultivo celular puede tratarse, por ejemplo, química o físicamente. El sobrenadante también se puede centrifugar. Pero también puede dejarse sin tratar, es decir, por ejemplo, puede purificarse según la invención sin centrifugación. Preferentemente se centrifuga, pero no se trata química ni enzimáticamente. Según la invención, el término sobrenadante de cultivo celular presupone que el medio de partida cosechado no se ha cromatografiado.

30 La "cromatografía" es un procedimiento que permite la separación de una mezcla de sustancias mediante una distribución diferente de sus componentes individuales entre una fase estacionaria y una móvil. En este sentido, la centrifugación no es cromatografía.

35 Una cromatografía de "fase inversa" es un procedimiento en el que la fase estacionaria es una fase no polar y la fase móvil es una fase polar. Cualquier sustancia inerte no polar que pueda empaquetarse como una columna puede usarse para cromatografía de "fase inversa". Ejemplos de fases estacionarias son un residuo octadecilo (C18) unido a sílice, un residuo octilo (C8), un material de sílice que lleva grupos ciano o grupos fenilo o material de sílice puro. Como una fase no polar. La elución en gradiente se usa a menudo en HPLC, por lo que la composición del disolvente se cambia lentamente (por ejemplo, de 80% a 20% de contenido de agua). Esto significa que los componentes no polares abandonan la columna muy tarde y los componentes polares muy temprano y, por lo tanto, es posible separarlos unos de otros.

40 Una "disrupción celular" en el contexto de la invención es una composición que resulta de la disrupción de las células. La disrupción como destrucción de la integridad celular puede lograrse mediante procedimientos químicos (por ejemplo, detergentes), procedimientos biológicos (por ejemplo, tratamiento enzimático) y/o procedimientos

físicos (por ejemplo, tratamiento de ultrasonido, fuerzas de cizalla). En este sentido, la disrupción celular puede representar un sobrenadante de cultivo celular.

El término "mezcla de traducción in vitro sin células" se refiere a un procedimiento experimental en biología molecular con la ayuda de la cual las moléculas de ARNm aisladas de las células o generadas por medio de la transcripción in vitro se usan en el recipiente de reacción para la biosíntesis de proteínas (traducción). Son útiles los llamados sistemas de traducción in vitro que contienen las enzimas necesarias y las moléculas de ARNt, así como los aminoácidos, de modo que la síntesis de proteínas se produce después de la adición del ARNm. La metionina marcada con el isótopo de azufre ³⁵S se agrega frecuentemente a la mezcla de reacción para poder detectar los productos de traducción. Los sistemas libres de células comunes son el extracto de germen de trigo y el lisado de reticulocitos.

La invención en detalle

De acuerdo con la invención, una composición que contiene VLP se filtra a través de un medio filtrante con un límite de exclusión de más de 30 kDa a 1500 kDa. Puede preferirse usar un medio filtrante con un límite de exclusión de al menos 40 kDa. En una forma de realización particular, el límite de exclusión del medio filtrante es de 80 a 1500 kDa; Se prefiere particularmente un límite de exclusión de aproximadamente 100 kDa.

Un medio filtrante que tiene un límite de exclusión en el intervalo mencionado anteriormente permite la separación eficiente de contaminantes de peso molecular más alto de la composición que contiene VLP mientras minimiza la pérdida de rendimiento de VLP.

La composición que contiene VLP es el sobrenadante del cultivo celular de las células secretoras de VLP. Este sobrenadante de cultivo celular puede tomarse directamente del cultivo celular y luego filtrarse de acuerdo con la invención. Sin embargo, en una forma de realización de la invención, también es posible que el sobrenadante de cultivo celular sea tratado de antemano, por ejemplo, química, enzimática o térmicamente. Bajo ciertas circunstancias, este tratamiento puede facilitar la filtración de acuerdo con la invención sin salir de la propia invención.

El medio filtrante que se puede usar según la invención puede consistir en un polímero o una mezcla de polímeros. Un polímero o mezcla de polímeros se selecciona preferiblemente del grupo que comprende celulosa, polietersulfona (PES), triacetato de celulosa (CTA), acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliacrilonitrilo (PAN), poliamida, policarbonato y politetrafluoroetileno (PTFE). Estos polímeros forman membranas de filtro estables que son inertes, no tienden a la agregación de proteínas y pueden propveer de cavidades de diámetro controlado.

En una forma de realización de la invención, al filtrar se crea una diferencia de presión entre 0,5 bares y 10 bares, preferiblemente entre 0,5 y 5 bares y de modo particularmente preferible entre 0,5 bares y 3 bares, entre el lado del filtrado y el compartimento del lado del retenido.

Numerosos procedimientos están disponibles para el experto en la materia para crear y regular una presión correspondiente. Al centrifugar la unidad de filtro, se puede ejercer una presión resultante sobre el retenido de acuerdo con la aceleración centrífuga. Además, aplicando una sobrepresión del lado retenido, por ejemplo, se puede generar una presión por medio de una bomba o un punzón. Alternativamente, la diferencia de presión también se puede generar aplicando una presión negativa en el lado del filtrado, por ejemplo, mediante una bomba de vacío. La diferencia de presión se puede mantener constante durante el tiempo de la purificación, pero también se puede generar una diferencia de presión variable en el tiempo que, por ejemplo, como programa de filtración, incluye diferentes fases con una duración de tiempo respectiva y una presión diferente.

En una forma de realización preferida, la filtración se puede llevar a cabo como la denominada "filtración de flujo transversal" (también llamada "flujo tangencial" o "filtración de flujo cruzado"). Aquí puede generarse un flujo cruzado a una alta velocidad, por ejemplo, de aproximadamente 2,5 a 3 m/s, que fluye a lo largo de una membrana o un medio filtrante. La alta velocidad evita que en la membrana pueda crearse una torta de filtro (capa superior o suciedad) a partir de las partículas sólidas que han de separarse.

En una forma de realización alternativa de la invención, la filtración también se puede llevar a cabo utilizando el procedimiento de dead-end (callejón sin salida). En la filtración dead-end, se bombea una corriente de alimentación contra la membrana con la presión más baja posible para minimizar la compactación de las sustancias retenidas. Debido al flujo de salida permanente del permeado, en la membrana se acumula una torta de filtro (capa superior o suciedad) o un gradiente de concentración (polarización de concentración) de las partículas de proteína a separar. La torta del filtro aumenta la resistencia a la filtración y, por lo tanto, la pérdida de presión a través de la membrana. Dependiendo de la composición de la alimentación, se debe eliminar a intervalos regulares mediante lavado a contracorriente (bombeando de nuevo el medio ya separado) y purificación química y, por lo tanto, el elemento del filtro se debe regenerar.

Según la invención, el medio filtrante puede tener diferentes geometrías, tal como puede formarse, por ejemplo, en forma de una membrana enrollada en espiral, membrana tubular o membrana de fibra hueca. La diferente geometría

del filtro considera las condiciones del procedimiento con respecto al volumen de la solución, la concentración/cantidad de VLP o contaminantes o diferencia de presión aplicada.

Además del sobrenadante de cultivo celular ya mencionado, en el procedimiento de purificación divulgado también pueden usarse otras composiciones que contienen VLP. Por lo tanto, los posibles medios de acuerdo con la divulgación se seleccionan del grupo de los siguientes medios:

- 5 (a) sobrenadante de cultivo celular del cultivo de células que expresan VLP;
- (b) sobrenadante de cultivo celular según (a) después de la purificación por centrifugación y/o diálisis;
- (c) disrupción celular de (a);
- (d) disrupción celular (posterior) después de la purificación por centrifugación y/o diálisis;
- 10 (e) mezcla de traducción in vitro sin células; o
- (f) mezcla de traducción in vitro sin células después de la purificación por centrifugación y/o diálisis.

En otra forma de realización de la invención, además de la purificación, también se logra que se concentre la composición que contiene VLP. Esto sucede preferiblemente porque el volumen de material retenido que disminuye durante la filtración no se completa o se completa solo parcialmente.

- 15 Según la invención, además de la purificación, también se consigue una reamortiguación de pH de la composición que contiene VLP. Este intercambio de amortiguador tiene lugar preferiblemente porque el volumen de material retenido que disminuye durante la filtración se reemplaza por un amortiguador que tiene una composición que difiere con respecto al amortiguador de partida.

- 20 En una forma de realización preferida, el pH se reduce, y es ventajoso un pH cercano al valor de pI de las proteínas de la cápside. Para las VLP que consisten en VP1, este es un pH entre 5,0 y 8,0. Este valor de pH reducido da como resultado una estabilidad reducida de las VLP, que se pueden disociar más fácilmente en una etapa de disociación posterior y, por ejemplo, se deben usar cantidades más pequeñas de agente reductor disociador de puente disulfuro y agente complejante que enlaza iones Ca^{2+} .

- 25 En una forma de realización de la invención, la composición que contiene VLP purificada usando el procedimiento de la invención se purifica de manera adicional mediante cromatografía, preferiblemente usando una cromatografía de intercambio aniónico.

- 30 La purificación adicional se lleva a cabo de modo preferido por separación usando un intercambiador de aniones (en particular débil). Este contiene grupos de amina primaria, secundaria o terciaria como grupos funcionales, en cuyo caso se prefieren los grupos dietilaminoetilo (DEAE). En una forma de realización preferida de la invención, la matriz de este intercambiador aniónico consiste en DEAE-Sepharose.

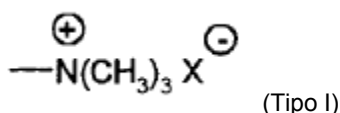
La elución de las VLP o los pentámeros VP1 de este intercambiador aniónico pueden prepararse según la invención mediante una solución que contiene NaCl que preferiblemente contiene NaCl en una concentración de 150 mM a 750 mM, de modo particularmente preferible NaCl de 300 mM.

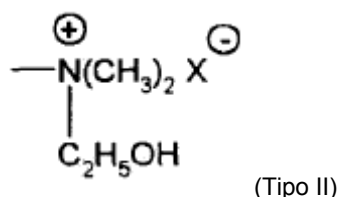
- 35 En otra forma de realización de la invención, la purificación adicional de la VLP por medio de un intercambiador de aniones comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar la composición que contiene VLP purificada por ultrafiltración;
- (b) poner en contacto la composición que contiene VLP con un intercambiador de aniones en condiciones que permitan que la VLP se una al intercambiador de aniones;
- (c) lavado opcional del intercambiador de aniones;
- 40 (d) elución de la VLP unida;
- (e) diálisis opcional de la VLP contra una solución acuosa.

Un intercambiador de aniones débil se utiliza preferiblemente para esto.

En otra forma de realización de la invención, la composición que contiene VLP purificada según la invención se purifica usando un intercambiador de aniones fuerte que contiene grupos de amonio cuaternario de tipo I o tipo II:





donde X es un anión seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, cloruro, sulfato, bromuro, yoduro, fluoruro, sulfuro, hidrosulfato, sulfuro de hidrógeno, fosfato, difosfato, monofosfato, carbonato, bicarbonato (hidrocarbonato), citrato, tartrato o ftalato.

- 5 En un aspecto preferido de la invención, se usa una matriz Q-Sepharose o una columna MonoQ como el intercambiador de aniones fuerte.

La VLP puede eluirse del intercambiador de aniones fuerte por una o más soluciones acuosas que contienen NaCl. La concentración de NaCl se puede variar mediante un gradiente que aumenta linealmente o un gradiente escalonado.

- 10 Se prefiere un gradiente como el gradiente lineal de NaCl en el que la concentración de NaCl del amortiguador de elución aumenta de un NaCl inicial de 100 mM a 1 M. Se prefiere un gradiente de tres o cuatro etapas como el gradiente escalonado de NaCl.

El gradiente escalonado de NaCl de tres etapas puede consistir preferiblemente en las siguientes etapas:

- (i) NaCl de 50 mM a 150 mM,
15 (ii) NaCl de 200 mM a 400 mM,
(iii) NaCl de 1 M a 2 M; o

El gradiente escalonado de NaCl de cuatro etapas puede consistir preferiblemente en las siguientes etapas:

- (i) NaCl de 50 mM a 150 mM,
(ii) NaCl de 200 mM a 400 mM,
20 (iii) NaCl de 500 mM a 800 mM
(iv) NaCl de 1 M a 2 M.

- En otra forma de realización de la invención, la composición que contiene VLP purificada usando el procedimiento de la invención se purifica adicionalmente mediante filtración en gel o mediante cromatografía en columna de hidroxipatita cerámica. Estos procedimientos permiten que la VLP se separe de los monómeros de la cápsida u oligómeros de la cápsida como, por ejemplo, pentámeros.

- 25 En una forma de realización de la invención, las VLP purificadas por el procedimiento de acuerdo con la invención se purifican por un procedimiento de acuerdo con las siguientes etapas:

- (a) disociación de las VLP;
(b) purificación de las VLP disociadas;
30 (c) Reasociación de las VLP disociadas.

La VLP se disocia preferiblemente en presencia de un agente reductor que disocia puentes de disulfuro y un agente complejante que une iones Ca^{2+} .

- En un aspecto de la invención, los compuestos que contienen azufre se usan como agentes reductores que disocian los puentes de disulfuro, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol (2-ME), ditiotreitól (DTT), ditiogeritol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), monotioglicerina y de modo particularmente preferible DTT.

- En los casos en que la toxicidad es particularmente crítica, se prefieren los agentes reductores que disocian puentes de disulfuro: 2-mercaptoetanol (2-ME) y monotioglicerina. 2-ME puede eliminarse fácilmente debido a su volatilidad, pero la monotioglicerina, por otro lado, también es adecuada para su posterior uso en cultivo celular.

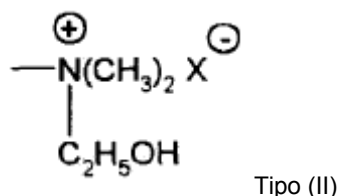
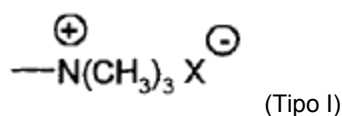
- 40 Los agentes reductores que contienen azufre son agentes reductores débiles, pero su potencial redox es suficiente para reducir los puentes de disulfuro y formar los residuos de cisteína libres. El uso de tales agentes reductores débiles tiene la ventaja de que no se reducen otros grupos funcionales de la VLP y, de esta manera, se conservan

esencialmente la integridad y la naturaleza nativa de las VLP. Según la invención, también es posible usar otros agentes reductores cuyo potencial redox se encuentre dentro del intervalo de los agentes reductores que contienen azufre mencionados anteriormente.

- 5 En otro aspecto de la invención, el agente complejante que enlaza el ion Ca^{2+} , utilizado en la disociación, es un agente quelante, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) o las sales correspondientes de estos ácidos y particularmente se prefiere EGTA.

- 10 En una forma de realización de la invención, las VLP disociadas, que están presentes preferiblemente como proteínas de la cápside, de modo particularmente preferible como proteínas VP1 o L1, se purifican adicionalmente mediante cromatografía, preferiblemente usando cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de "fase inversa".

En una forma de realización preferida, se usa un intercambiador de aniones fuerte que contiene grupos de amonio cuaternario de tipo I o tipo II:



- 15 donde X es un anión seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, cloruro, sulfato, bromuro, yoduro, fluoruro, sulfuro, hidrosulfato, sulfuro de hidrógeno, fosfato, difosfato, monofosfato, carbonato, bicarbonato, citrato, tartrato o ftalato.

- 20 En un aspecto preferido de la invención, se usa una matriz Q-Sepharose o una columna MonoQ como el intercambiador de aniones fuerte.

- Según la invención, la VLP disociada (o las proteínas estructurales de la misma) se puede eluir del intercambiador aniónico fuerte mediante una o más soluciones acuosas que contienen NaCl. La concentración de NaCl se puede variar mediante un gradiente que aumenta linealmente o un gradiente escalonado. Se prefiere un gradiente como el gradiente lineal de NaCl en el que la concentración de NaCl del amortiguador de elución aumenta de NaCl de 100 mM inicial a 1 M. Se prefiere un gradiente de tres o cuatro etapas como el gradiente escalonado de NaCl.

- 25 El gradiente escalonado de NaCl de tres etapas puede consistir preferiblemente en las siguientes etapas:

- (i) NaCl de 50 mM a 150 mM,
- (ii) NaCl de 200 mM a 400 mM,
- (iii) NaCl de 1 M a 2 M; o

- 30 El gradiente escalonado de NaCl de cuatro etapas puede consistir preferiblemente en las siguientes etapas:

- (i) NaCl de 50 mM a 150 mM,
- (ii) NaCl de 200 mM a 400 mM,
- (iii) NaCl de 500 mM a 800 mM
- (iv) NaCl de 1 M a 2 M.

- 35 En otra forma de realización de la invención, la purificación de la VLP disociada por medio de un intercambiador de aniones comprende las siguientes etapas:

- (c) poner en contacto la composición que contiene VLP disociada con un intercambiador de aniones en condiciones que permitan que la VLP disociada se una al intercambiador de aniones;
- (d) lavado opcional del intercambiador de aniones;

(e) elución de la VLP disociada unida;

(f) diálisis opcional de la VLP disociada contra una solución acuosa.

Para ello se usa preferiblemente un intercambiador de aniones fuerte.

5 Según la invención, la VLP disociada también puede purificarse mediante un intercambiador aniónico débil. Este contiene grupos de amina primaria, secundaria o terciaria como grupos funcionales, en cuyo caso se prefieren los grupos dietilaminoetilo (DEAE). En una forma de realización preferida de la invención, la matriz del intercambiador aniónico débil consiste en DEAE-Sepharose.

10 De acuerdo con la invención, la VLP disociada se eluye del intercambiador aniónico débil mediante una solución que contiene NaCl que preferiblemente contiene NaCl en una concentración de 150 mM a 750 mM, de modo particularmente preferible NaCl de 300 mM.

En otra forma de realización de la invención, la purificación de la VLP disociada por medio de un intercambiador de aniones comprende las siguientes etapas:

(c) poner en contacto la composición que contiene VLP disociada con un intercambiador de aniones en condiciones que permitan que la VLP disociada se una al intercambiador de aniones;

15 (d) lavado opcional del intercambiador de aniones;

(e) elución de la VLP disociada unida;

(f) diálisis opcional de la VLP disociada contra una solución acuosa.

Un intercambiador de aniones débil se utiliza preferiblemente para esto.

20 En una forma de realización de la invención, las VLP disociadas se purifican por medio de cromatografía de fase inversa. Aquí se prefiere la purificación por "cromatografía líquida de alto desempeño" (HPLC) usando una columna de fase inversa. Esto permite que incluso grandes cantidades de VLP disociadas se purifiquen en poco tiempo.

25 En otra forma de realización de la invención, las VLP disociadas se purifican usando cromatografía de permeación en gel. Este procedimiento se usa preferiblemente en casos en los que se usan proteínas de cápsida modificadas, a las que se les da un peso molecular diferente por la modificación (en particular inserciones o deleciones) y, por lo tanto, se pueden separar de las proteínas de cápsida no modificadas.

Las VLP disociadas pueden purificarse opcionalmente mediante una diálisis adicional para, por ejemplo, realizar un intercambio de los componentes del amortiguador. Para diálisis se usa preferiblemente un amortiguador de pH que es osmomolar con respecto a la sangre. Se prefiere particularmente el uso de solución salina fisiológica como amortiguador de pH de diálisis.

30 La diálisis se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, en cuyo caso se prefiere una temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$. La duración de la diálisis es convenientemente de al menos 12 horas y preferiblemente es mayor de 16 horas. La diálisis puede durar hasta 48 horas.

35 Para almacenar las VLP disociadas, es ventajoso tomar las VLP disociadas en un amortiguador con un pH bajo (5,0 a 7,5) y con una mayor concentración de NaCl (250 mM a 500 mM). Esto evita la agregación. El almacenamiento se lleva a cabo a una temperatura de -80°C . Alternativamente, las VLP disociadas también pueden convertirse en una forma de almacenamiento estable mediante liofilización.

40 En una forma de realización particular, la VLP puede contener una o más sustancias en el interior de la estructura de la cápsida. Dichas sustancias incluyen, por ejemplo, macromoléculas como, por ejemplo, ácidos nucleicos, es decir, ARN, ADN o ácidos nucleicos artificiales modificados, así como proteínas y otras sustancias fisiológicamente activas, que pueden ser naturales, sintéticas o recombinantes. Ejemplos de tales sustancias fisiológicamente activas son, por ejemplo, lípidos, fosfolípidos, péptidos, fármacos, toxinas, etc.

45 La VLP purificada y opcionalmente cargada con sustancia activa puede reasociarse mediante diálisis con un amortiguador de reasociación que contiene cationes divalentes o, si no, el catión monovalente Rb^+ . Este amortiguador contiene preferiblemente un catión seleccionado del grupo que consiste en Mg^{2+} , Rb^+ o Zn^{2+} y de modo particularmente preferido Ca^{2+} . El amortiguador de reasociación contiene 0,1 mM a 10 mM de iones Ca^{2+} , preferiblemente 0,5 mM a 5 mM de iones Ca^{2+} y en especial 1 mM de CaCl_2 .

En otra forma de realización de la invención, las VLP cargadas con la sustancia activa se purifican por medio de cromatografía de permeación en gel. Esto permite que las moléculas de sustancia activa se separen de las VLP cargadas con moléculas objetivo.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de purificación que, a partir de un sobrenadante de cultivo celular, da como resultado una composición que contiene VLP con una pureza de VLP de al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, en particular al menos 95% o lo más preferiblemente al menos 99% y, por lo tanto, es superior a los procedimientos de purificación VLP anteriores. La pureza de la VLP significa la proporción relativa de la VLP en la mezcla total de sustancias como resultado del procedimiento de purificación. Esta composición de VLP está libre de PEG y/o sales y preferiblemente libre de PEG.

Las VLP consisten esencialmente o exclusivamente en la proteína de la cápside VP1 que se deriva de la proteína de la cápsida VP1 del poliomavirus humano JC (JCV) o es idéntica a ella. La secuencia de la VP1 del poliomavirus humano JC se reproduce en la SEQ. ID. NO. 1.

Para la preparación de VP1 recombinante en células de insecto, de acuerdo con la invención puede usarse un ácido nucleico que se ha optimizado para la expresión en estas células puede usarse. Por ejemplo, se puede usar la secuencia mostrada en SEQ. ID. NO. 2 o una secuencia complementaria a la misma, una secuencia correspondiente a esta secuencia en el contexto de la degeneración del código genético o una secuencia hibridizante con estas en condiciones rigurosas. Para este propósito, la secuencia de ácido nucleico o un vector recombinante que contiene esta secuencia se introduce en una célula anfitriona adecuada, la célula anfitriona se cultiva en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácido nucleico y la proteína se aísla de la célula o del sobrenadante celular. Las condiciones de hibridación estrictas se definen preferiblemente de acuerdo con Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e incluyen una etapa de lavado de 30 minutos en 0,1 x SSC, 0,5% SDS a 60°C, y preferiblemente 68°C.

En el contexto de la presente invención, por lo tanto, se usa preferiblemente un polipéptido VP1, que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ. ID. NO. 3, que tiene al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, de manera particularmente preferible al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95% de la secuencia de aminoácidos idéntica, en cuyo caso se determina la identidad en todo el intervalo de SEQ ID No. 3.

En otra forma de realización, se usa una proteína VP1 en la que la secuencia de aminoácidos en la región N-terminal, por ejemplo, fue cambiada en el intervalo de 25 aminoácidos N-terminales. Una señal de localización nuclear heteróloga se introduce preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la VP1. Las señales de localización nuclear preferidas contienen la secuencia de aminoácidos CPGAAPX1X2P, donde X1 y X2 denotan cualquier aminoácido y de preferencia respectivamente K y, por ejemplo, se basan en las señales de localización del núcleo de SV40 o BKV. Las secuencias de aminoácidos de las señales de localización nuclear particularmente preferidas se describen en el documento EP 2 036 980 A1, que con esto se incorpora por completo a la presente solicitud.

La VP1 preparada por expresión recombinante se expresa preferiblemente en células eucariotas y de manera particularmente preferible en células de insecto.

En otra forma de realización, se utiliza una proteína VP2 (SEQ ID N° 6), una proteína VP3 (SEQ ID N° 10), una proteína L1 (SEQ ID N° 13) o una proteína L2 (SEQ ID N° 15).

Las secuencias de ácido nucleico de tipo silvestre se pueden usar para la expresión recombinante, por ejemplo, la SEQ ID No. 4 para VP2, la SEQ ID No. 8 para VP3, la SEQ ID No. 12 para L1 y la SEQ ID No. 14 para L2.

En otra forma de realización, las secuencias de ácido nucleico están optimizadas con codones para el sistema de expresión correspondiente. En una forma de realización particular, las siguientes secuencias de ácido nucleico se usan para la expresión en células de insecto: SEQ ID No. 2 para una proteína VP1, SEQ ID No. 5 para una proteína VP2, SEQ ID No. 7 para una proteína VP2-HA, SEQ ID N° 9 para una proteína VP3-HA.

En una forma de realización particular, la proteína N-terminal o C-terminal respectiva se cambia para mejorar el uso como vacuna. En una forma de realización particular, este es un péptido localizado en el extremo C que comprende el epítipo de hemaglutinina (abreviado como "HA"). Ejemplos de una proteína modificada de este tipo son la proteína VP2-HA (SEQ ID No. 7) y la proteína VP3- HA (SEQ ID No. 11).

En una forma de realización preferida, para la expresión recombinante de las proteínas de la cápside VP1, VP2, VP2-HA, VP3-HA, L1 o L2 y, por lo tanto, para proporcionar VLP se usan células de *Spodoptera frugiperda* como, por ejemplo, la línea celular SF9, la línea celular SF21 o la línea celular SF158. También se pueden usar otras líneas celulares de insectos, por ejemplo, *Trichoplusia ni* TN-368, IAL-TND1, *Lymantria dispar* IPLB-LdFB, *Mamestra brassica* IZD-MB0503, *L. dispar* IPLB-LdElta, *Anticarsa gemmatilis* UFL AG286, *Plodia interpunctella* IAL-PID2, *Plutella xylostella* BCIRL-PxHNU3, *T. ni* BTI-TN5B1-4 (HiFive®), *Manduca sexta* MRRL-CH1, líneas de *Heliothis virescens*: IPLB-HvT1, IPLB-HvE1A, IPLB-HvE6A y la línea celular *Diabrotica undecimpunctata* IPLB-DU182A.

Las VLP de acuerdo con la invención pueden usarse para fines de diagnóstico y terapéuticos, por ejemplo, para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones. Para este propósito, pueden contener sustancias terapéuticamente activas o también pueden usarse sin sustancias incluidas.

En una forma de realización preferida, la enfermedad es una infección causada por el virus JC, como PML.

EJEMPLO 1: Preparación de una "cepa de semilla" de baculovirus

1. Preparación del bácmido recombinante.

La secuencia optimizada con codón según la SEQ. ID. NO. 2 del gen VP1 se clonó en plásmidos pFastBac1 de GENEART. El plásmido pFastBac1 se transformó en células de DH5alfa E. coli, las células bacterianas se incrementaron y las bacterias se almacenaron como reservas de glicerina a -80°C. El plásmido pFasBac-VP1 se transformó en células de E. coli DH10Bac para aumentar el ADN de Baculo.

1.1. Transformación de la bacteria DH10Bac E. coli.

Para revitalizar la bacteria DH10Bac E. coli, las células Max Efficiency DH10Bac E. coli se retiran del congelador ultrabajo (-80°C), se descongelan en hielo y se extraen respectivamente 100 µl de la bacteria y se transfieren a un tubo de ensayo de 10 ml.

1.2. Las células DH10Bac E. coli se mezclan con 1 ng (=1 µL) de plásmido pFasBac-VP1 y se incuban en hielo durante 30±3 min. Las bacterias se transformaron con el plásmido de ADN pFastBac1-VP1.

1.3. El ADN recombinante de baculo VP1 se aísla de acuerdo con procedimientos estándar.

2. Revitalización de las células SF9 criopreservadas

Para revitalizar las células SF9, se retira un criotubo de las células SF9 del tanque de almacenamiento de nitrógeno y se descongela. Después del final del procedimiento de descongelación, las células en el tubo de ensayo de 15 ml se distribuyen uniformemente invirtiendo cuidadosamente tres veces y se toma una alícuota para determinar el número de células y la vitalidad (número de células vivas).

Una vez que se completa el procedimiento de descongelación, las células se transfieren a una botella de cultivo celular de un tamaño adecuado (T75 o T175), de modo que se logra una densidad celular de 3×10^5 células vitales por mililitro. En el caso de un T75, la suspensión celular se ajusta a un volumen de ≤30 ml, en el caso de una botella de cultivo celular T175, la suspensión celular se ajusta a un volumen de >30 ml y ≤50 ml de medio completo y se transfiere a la botella de cultivo celular. Para la expansión, las células SF9 se incuban en una incubadora a una temperatura de 26°C y una humedad de ≥80%.

3. Expansión de las células

Las células se incuban en la incubadora hasta que la capa celular tenga una densidad superior al 70%. Luego, se separan las células del fondo del recipiente de cultivo celular y se distribuyen a una botella más grande de cultivo celular o a varias botellas de cultivo celular. Para este propósito, las células en la botella de cultivo celular se enjuagan con amortiguador PBS y se separan de su superficie de crecimiento con el raspador celular. Para distribuir las células de manera uniforme en el medio completo, el recipiente de cultivo se gira cuidadosamente y luego se toma una alícuota para el recuento de células. Al volver a sembrar, se siembran 1×10^6 células/pocillo en 3 ml de medio completo.

4. Transfección de las células de insecto con complejos recombinantes VP1-Baculo-ADNCellfectina

De 16 hasta 24 horas después de sembrar las células en placas de 6 pocillos, se retira el recipiente de cultivo celular de la incubadora, se disminuye el medio completo y se agrega 1 ml de medio precalentado, sin suero por pocillo.

Ahora se preparan los complejos ADN-Cellfectina. Para este fin, se mezclan 8 µl de reactivo Cellfectina con 100 µl de medio sin suero. Se diluyen 2 µg (=2 µL) de VP1-Baculo-ADN con medio sin suero. El lote de Cellfectina se purifica con el lote de VP1-Baculo-ADN y se incuba durante 30±2 min a temperatura ambiente (20 ± 4°C). Se pipetea 210 µl de los lotes de transfección Cellfectina-ADN en cada pocillo de la placa de 6 pocillos y las células se incuban en la incubadora durante 5 horas ± 15 minutos a 26 ± 1°C. Luego, el medio se retira de los pocillos individuales de la placa de 6 pocillos utilizando el lote de transfección Cellfectina-ADN y se añaden 2 ml/pocillo de medio completo. Las células transfectadas se incuban adicionalmente durante 72 ± 1 hora a 26 ± 1°C. Los baculovirus recombinantes se liberan en el medio de cultivo celular durante este tiempo. Para recolectar los baculovirus recombinantes, el medio de cultivo celular que contiene el virus de las células transfectadas se retira y se transfiere a un tubo de muestra de 15 ml y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 × g a 4°C para separar los restos celulares contenidos en las células lisadas del medio de cultivo celular que contiene el virus. A continuación, el medio de cultivo celular que contiene virus (el sobrenadante) se transfiere a un tubo de muestra de 2 ml y se almacena a 5 ± 3°C hasta su uso posterior. Los baculovirus se llaman P1. 1 ml de estos se almacena a -80 ± 5°C. El volumen restante se almacena para la preparación de la cepa de semillas.

5. Preparación de la cepa de semillas de baculovirus

5.1. Preparación de células de insecto Sf9 para la preparación de baculovirus.

Las células se incuban en la incubadora hasta que la capa de células tenga una densidad superior al 70%. Luego, las células se desprenden del fondo del recipiente de cultivo celular y se distribuyen sobre una superficie de crecimiento más grande o varias botellas de cultivo celular. Para este propósito, las células en la botella de cultivo celular se enjuagan con amortiguador PBS y se desprenden de su superficie de crecimiento con el raspador celular. Para distribuir las células de manera uniforme en el medio completo, el recipiente de cultivo se gira cuidadosamente y luego se toma una muestra para determinar el número de células. Por medio del número determinado de células, se siembran 5×10^6 células por botella de cultivo de células T25 en 5 ml de medio completo.

5.2. Infección de las células SF9 con los baculovirus recombinantes

De 16 hasta 24 horas después de sembrar las células, se retira la botella de cultivo celular de la incubadora y se comprueba el medio completo visualmente y microscópicamente en busca de turbidez y, por lo tanto, de posible contaminación. Luego se retira el medio completo y se agregan 4 ml de nuevo medio completo precalentado. Se agrega 1 ml de baculovirus P1 en medio completo. Durante la siguiente infección, las células SF9 se incuban con los baculovirus recombinantes a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante $3 (\pm 1)$ días en la incubadora.

5.3. Cosecha del baculovirus recombinante

Para recolectar los baculovirus producidos, el medio de cultivo celular de las células infectadas se retira y se transfiere a un tubo de ensayo de 15 o 50 ml y se centrifuga durante 10 minutos a $2000 \times g$ a 4°C para separar los restos celulares contenidos de las células lisadas del medio que contiene el virus. El medio de cultivo celular que contiene el virus (sobrenadante) se almacena a $5 (\pm 3)^\circ\text{C}$.

Para cuantificar el título de los virus, el ADN del baculovirus se aísla de 150 μl de medio que contiene virus y se amplifica y cuantifica por medio de PCR cuantitativa. Los baculovirus se denominan P2 y se almacenan a $-80 \pm 5^\circ\text{C}$.

6. Almacenamiento de baculovirus recombinantes.

Cada ml de P1 y P2 se toman dos veces y se transfieren a criotubos de 2 ml etiquetados y se almacenan como muestras de reserva a $-80 (\pm 5)^\circ\text{C}$.

EJEMPLO 2: Preparación de VP1-VLP por expresión mediada por baculovirus en células SF9

1. Revitalización de las células SF9 criopreservadas.

Para revitalizar las células SF9, se retira un criotubo de las células SF9 del tanque de almacenamiento de nitrógeno en la habitación B. OG 2.4.06 y se descongela. Después del final del procedimiento de descongelación, las células se distribuyen uniformemente en el tubo de ensayo de 15 ml mediante una cuidadosa inversión y se toma una muestra para determinar el número de células y la vitalidad (número de células vivas).

Una vez que se completa el procedimiento de descongelación, las células se transfieren a una botella de cultivo celular de un tamaño adecuado (T75 o T175, botellas de suspensión de 500 ml), de modo que se logra una densidad celular de 3×10^5 células por mililitro. El tamaño de la botella de cultivo celular depende del número de células congeladas y su vitalidad después de la descongelación. En el caso de un T75, la suspensión celular se ajusta a un volumen >10 y ≤ 30 ml, en el caso de una botella de cultivo celular T175, la suspensión celular se ajusta a un volumen de >30 ml y ≤ 50 ml de medio completo y se transfiere a la botella de cultivo celular. Para la expansión, las células SF9 se incuban en una incubadora a una temperatura de 26°C y una humedad de $\geq 80\%$.

2. Expansión de las células.

Las células se incuban en la incubadora hasta que la capa de células tenga una densidad superior al 70%. Luego, las células se enjuagan con amortiguador PBS, se desprenden del fondo del recipiente de cultivo celular con un raspador celular estéril y se distribuyen en una botella de cultivo celular más grande o en varias. Para distribuir las células de manera uniforme en el medio completo, el recipiente de cultivo se gira cuidadosamente y luego se extrae una para determinar la cantidad de células. El número de células determinado determina el volumen del medio completo en el que las células se resuspenden posteriormente y el tamaño o número de botellas de cultivo celular en las que se transfieren las células SF9. Se aplica lo siguiente: se siembran 3×10^5 células/ml de medio completo. La suspensión celular se transfiere a una botella T75 de 12 a 30 mililitros y a una botella T175 de 30 a 50 mililitros, y de 300 a 500 ml en la botella de suspensión. Un día después de transferir las células SF9 a nuevas botellas de cultivo celular, se inicia la preparación de las células SF9 para la infección con baculovirus.

3. Infección de las células SF9 con baculovirus

3.1. Preparación de las células SF9 para la infección con baculovirus.

Antes del propio procedimiento de infección, las células SF9 se desprenden de su superficie de crecimiento, se determina el número de células vitales y las células se transfieren a una o más botellas de cultivo celular T175 o a una botella de suspensión de 500 ml. Para este propósito, se siembran 3×10^7 células en 50 ml de medio completo por botella de cultivo celular T175 y 30 a 50×10^8 por botella de suspensión de 500 ml en medio sin suero.

3.2. Infección de las células SF9 con baculovirus

De 16 hasta 24 horas después de sembrar las células, se retira la botella de cultivo celular de la incubadora, se retira el medio completo y se añaden 10 ml de medio precalentado, sin suero. Ahora la botella de cultivo celular se gira cuidadosamente y el medio sin suero se retira nuevamente. Para que la capa de células no se seque, se añaden inmediatamente 10 ml de medio sin suero y la cantidad de baculovirus recombinantes se pipetea en medio completo, de modo que se logra una multiplicidad de la infección (MOI) de 1. Las células en suspensión SF9 se infectan con MOI 5 directamente en volumen completo. Durante la siguiente infección, las células SF9 se incuban con los baculovirus durante 20 ± 5 min a temperatura ambiente ($20 \pm 4^\circ\text{C}$). Luego se añaden 30 ml de medio de cultivo celular sin suero a cada botella de cultivo celular T175 y las células adherentes o en suspensión se incuban en la incubadora durante otros 5 (± 1) días.

4. Cosecha de VP1 -VLP.

Para cosechar la VP1-VLP, se extrae el medio de cultivo celular de las células infectadas y se transfiere a un tubo de muestra de 50 ml y se centrifuga durante 60 minutos a 5000xg y 5°C para separar los restos celulares contenidos de las células lisadas del medio que contiene proteínas. El medio de cultivo celular que contiene proteínas (sobrenadante) se transfiere a un vaso de precipitados adecuado y se almacena a $5 (\pm 3)^\circ\text{C}$.

EJEMPLO 3: Purificación del VP1-VLP utilizando un intercambiador de aniones débil

1. Purificación de VP1-VLP utilizando DEAE-FPLC

Las VP1-VLP en el medio de cultivo celular se purifican mediante filtración de flujo cruzado (sistema Vivoflow Easy Load de Sartorius) y también se concentran en la misma etapa del procedimiento. El sistema de flujo cruzado está preparado para su uso. Se colocan 500 ml de ddH₂O en un depósito adecuado y se lava el sistema con este. El intervalo de presión es de 1,5 a 2,5 bares. Se colocan 500 ml de Tris-HCl 10 mM en el depósito, se lava el sistema con este. El intervalo de presión es de 1,5 a 2,5 bares.

El sobrenadante del cultivo celular se libera de posibles restos celulares en una etapa de centrifugación. El sobrenadante de cultivo celular clarificado se transfiere al depósito y se bombea a través del sistema. El volumen original se reduce a la mitad y luego se conecta un depósito más grande (generalmente con un volumen de 1 a 2 l) con el sistema amortiguador estándar (Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 100 mM). El medio se intercambia luego con un sistema amortiguador Tris-HCl (Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 100 mM). El volumen se reduce a 150 ml. Esta filtración de flujo cruzado elimina todas las impurezas de bajo peso molecular, incluidas las proteínas y los fragmentos de proteínas con un tamaño de 100 kDa.

Las VLP están inicialmente presentes en la muestra como partículas intactas. La siguiente cromatografía de intercambio aniónico separa las contaminaciones de proteínas y los ácidos nucleicos libres contenidos en la muestra. Se utiliza una columna DEAE-Sepharose como un intercambiador de iones débil. Las VLP se miden en el amortiguador estándar usando un gradiente lineal de NaCl (NaCl de 100 mM a 1 M) o se eluyen por gradientes escalonados (3 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM y 3. NaCl de 1M a 2M; 4 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM, 3. NaCl de 500 mM a 800 mM y 4. 1 M a NaCl 2 M).

2. Post-purificación opcional por diálisis

Opcionalmente, la muestra que contiene VLP se dializa contra Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 50 a 150 mM, pH 7,5 durante 24 ± 2 horas para establecer la concentración de sal correctamente.

3. Almacenamiento del VP1-VLP,

Las VP1-VLP se diluyen con Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 150 mM, pH 7,5 a la concentración de 0,5 mg/ml, se distribuyen en alícuotas en tubos de ensayo de 1,5 ml y se almacenan a $-80 \pm 5^\circ\text{C}$.

EJEMPLO 4: Purificación del VP1-VLP utilizando un intercambiador de aniones fuerte

1. Purificación de VP1-VLP usando Q-Sepharose FPLC

Las VP1-VLP en el medio de cultivo celular se purifican mediante filtración de flujo cruzado (sistema Vivoflow Easy Load de Sartorius) y también se concentran en la misma etapa del procedimiento. El sistema de flujo cruzado está preparado para su uso. Se colocan 500 ml de ddH₂O en un depósito adecuado y se lava el sistema con el mismo. El intervalo de presión es de 1,5 a 2,5 bares. Se colocan 500 ml de Tris-HCl de 10 mM en el depósito, se lava el sistema con el mismo. El intervalo de presión es de 1,5 a 2,5 bares.

El sobrenadante del cultivo celular se libera de posibles restos celulares en una etapa de centrifugación. El sobrenadante de cultivo celular clarificado se transfiere al depósito y se bombea a través del sistema. El volumen original se reduce a la mitad y luego se conecta un depósito más grande (generalmente con un volumen de 1 a 2 l) con el sistema amortiguador estándar (Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 100 mM). El medio se intercambia luego con un sistema amortiguador Tris-HCl (Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 100 mM). El volumen se reduce a 150 ml. Esta filtración

de flujo cruzado elimina todas las impurezas de bajo peso molecular, incluidas las proteínas y los fragmentos de proteínas con un tamaño de 100 kDa.

Las VLP están inicialmente presentes en la muestra como partículas intactas. La siguiente cromatografía de intercambio aniónico separa las contaminaciones de proteínas y los ácidos nucleicos libres contenidos en la muestra. Aquí se usa una columna Q-Sepharose como un intercambiador iónico fuerte. Las VLP se miden en el amortiguador estándar usando un gradiente lineal de NaCl (NaCl de 100 mM a 1 M) o se eluyen por gradientes escalonados (3 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM y 3. NaCl de 1M a 2M; 4 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM, 3. NaCl de 500 mM a 800 mM y 4. NaCl de 1 M a 2 M).

2. Post-purificación opcional por diálisis.

10 Opcionalmente, la muestra que contiene VLP se dializa luego contra Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 50 a 150 mM, pH 7,5 durante 24 ± 2 horas para establecer la concentración de sal correctamente.

3. Almacenamiento del VP1-VLP.

Las VP1-VLP se diluyen con Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 150 mM, pH 7,5 a la concentración de 0,5 mg/ml, se distribuyen en alícuotas en tubos de ensayo de 1,5 ml y se almacenan a $-80 \pm 5^\circ\text{C}$.

15 **EJEMPLO 5:** Purificación de los pentámeros VP1 usando un intercambiador aniónico débil

1. Disociación de las VLP en pentámeros VP1

En la primera etapa, las VLP en la muestra se disocian agregando DTT de 5 a 20 mM y EGTA de 10-30 mM (concentración final) a temperatura ambiente durante 1 hora y se aplican a una columna con una matriz DEAE como un intercambiador aniónico débil con matriz DEAE. Esta etapa es esencial para obtener una pureza de casi el 100% de los pentámeros VP1, ya que en esta etapa se eliminan los ácidos nucleicos empaquetados y otros contaminantes. Los pentámeros se tratan con un gradiente lineal de NaCl (NaCl de 100 mM a 1 M), o se eluyen por gradientes escalonados (3 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM y 3. NaCl de 1M a 2M; 4 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM, 3. NaCl de 500 mM a 800 mM y 4. NaCl de 1 M a 2 M).

2. Post-purificación opcional por diálisis

25 En el caso de que se requiera una reducción en la concentración de sal, la solución que contiene pentámeros VP1 se puede dializar opcionalmente contra solución salina fisiológica durante la noche a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Al envasar ingredientes activos, los pentámeros VP1 se mezclan con el ingrediente activo sin esta etapa opcional de purificación posterior (véase la siguiente etapa 3).

3. Mezcla de los pentámeros VP1 con los ingredientes activos.

30 Se mezclan 1 μg a 100 μg de pentámeros VP1 purificados con 1 a 10 μg de ADN plasmídico. La mezcla se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se coloca en una cámara de diálisis (por ejemplo, de Pierce) con tamaños de poro entre 5kDa y 20kDa. Las cámaras de diálisis se colocan en un amortiguador de reasociación.

4. Reasociación de los pentámeros VP1 en las VLP

35 Los pentámeros VP1 se reasocian en las VLP por diálisis contra un denominado amortiguador de reasociación que contiene CaCl_2 de 1 a 5 mM, Tris-HCl de 10 mM y NaCl de 150 mM, pH 7,5) a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24-48 h.

5. Almacenamiento de las VLP que contienen ingrediente activo

Luego, las VLP se almacenan a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta su posterior tratamiento o se congelan a -80°C para su almacenamiento permanente.

EJEMPLO 6: Purificación de los pentámeros VP1 usando un intercambiador de aniones fuerte

40 Las VP1-VLP en el medio de cultivo celular se purifican mediante filtración de flujo cruzado (sistema Vivoflow Easy Load de Sartorius) y también se concentran en la misma etapa del procedimiento. El sistema de flujo cruzado está preparado para su uso. Se colocan 500 ml de ddH₂O en un depósito adecuado y se lava el sistema con el mismo. El intervalo de presión es de 1,5 a 2,5 bares. Se colocan 500 ml de Tris-HCl de 10 mM en el depósito, se lava el sistema con el mismo. El intervalo de presión es de 1,5 a 2,5 bares.

45 El sobrenadante del cultivo celular se libera de los restos celulares en una etapa de centrifugación. El sobrenadante de cultivo celular clarificado se transfiere al depósito y se bombea a través del sistema. El volumen original se reduce a la mitad y luego se conecta un depósito más grande (generalmente con un volumen de 1 a 2 litros) con el sistema de amortiguador estándar (generalmente se usa Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 100 mM como el amortiguador estándar). El medio se intercambia luego con un sistema de amortiguador Tris-HCl (generalmente se usa Tris-HCl de 10 mM, NaCl de 100 mM como el amortiguador estándar). El volumen se reduce a 150 ml. Esta filtración de flujo

cruzado elimina todas las impurezas de bajo peso molecular, incluidas las proteínas y los fragmentos de proteínas con un tamaño de 100 kDa.

2. Disociación de las VLP en pentámeros VP1

5 En la primera etapa, las VLP en la muestra se disocian agregando DTT de 5 a 20 mM y EGTA de 10-30 mM (concentración final) a temperatura ambiente durante 1 hora y se aplican a una columna Mono Q o columna Q Sepharose. Esta etapa es esencial para obtener una pureza de casi el 100% de los pentámeros VP1, porque en esta etapa se eliminan los ácidos nucleicos empaquetados y otros contaminantes. Los pentámeros se tratan con un gradiente lineal de NaCl (NaCl de 100 mM a 1 M), o se eluyen por gradientes escalonados (3 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM y 3. NaCl de 1M a 2M; 4 etapas: 1. NaCl de 50 a 150 mM, 2. NaCl de 200 a 400 mM, 3. NaCl de 500 mM a 800 mM y 4. NaCl de 1M a 2 M).

3. Post-purificación opcional por diálisis

15 En el caso de que se requiera una reducción en la concentración de sal, la solución que contiene pentámeros VP1 se puede dializar opcionalmente durante la noche contra solución salina fisiológica a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Al envasar ingredientes activos, los pentámeros VP1 se mezclan con el ingrediente activo sin esta etapa opcional de purificación posterior (véase la siguiente etapa 3).

4. Mezcla de los pentámeros VP1 con los ingredientes activos.

1 μg a 100 μg de los pentámeros VP1 purificados se mezclan con 1 a 10 μg de ADN plasmídico. La mezcla se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se coloca en una cámara de diálisis (por ejemplo, de Pierce) con tamaños de poro entre 5kDa y 20kDa. La diálisis se lleva a cabo contra un amortiguador de reasociación.

5. Reasociación de los pentámeros VP1 en las VLP

Los pentámeros VP1 se reasocian en las VLP por diálisis contra un denominado amortiguador de reasociación que contiene CaCl_2 de 1 a 5 mM, Tris-HCl de 10 mM y NaCl de 150 mM, pH 7,5) a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24-48 h.

6. Almacenamiento de las VLP que contienen ingrediente activo

25 Luego, las VLP se almacenan a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta su posterior tratamiento o se congelan para un almacenamiento permanente a -80°C o se liofilizan alternativamente.

Abreviaturas

Bácmido	= vector lanzadera (shuttle), propagable en E. coli y en células de insecto
FCS	= suero fetal de ternera
LAF	= flujo de aire laminar
30 min	= minutos
rpm	= revoluciones por minuto
RT	= temperatura ambiente
T25, T75, T175	= botellas de cultivo celular con área de crecimiento 25, 75 o 175 cm^2
medio completo	= Medio de insecto TC-100 con 10% de suero de ternera fetal
35 VLP	= partícula similar a virus
VP1	= proteína 1 viral del virus JC

Listado de figuras

Fig. 1: Diagrama de flujo para la preparación de baculovirus que codifican VP1 por transfección de células de insecto SF9.

40 Fig. 2: Diagrama de flujo para la recolección de los baculovirus para crear una "cepa de semillas".

Fig. 3: Diagrama de flujo para el procedimiento de preparación de VLP: Parte 1 infección de las células SF9

Fig. 4: Diagrama de flujo para el procedimiento de preparación de VLP: Parte IIa Purificación de las VLP por FPLC con un intercambiador de aniones fuerte

Fig. 5: Diagrama de flujo para el procedimiento de preparación de VLP: Parte 3a Disociación de las VLP y purificación de los pentámeros usando un intercambiador de aniones débil

FIG. 6: Diagrama de flujo para el procedimiento de preparación de VLP: Parte 3b Purificación de las VLP por disociación y cromatografía con un intercambiador de aniones fuerte.

- 5 Fig. 7: Secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápsida de VP1 derivada del virus poliovirus JC junto con la secuencia de nucleótidos que codifica para la misma, que fue optimizada con codón para la expresión en células de insecto

Listado de secuencias

<110> Life Science Inkubator Betriebs GmbH & Co. KG

- 10 <120> procedimiento para la purificación de partículas similares a virus (VLP)

<130> 53730 K

<160> 15

<170> Patente version 3.5

<210> 1

- 15 <211> 1065

<212> ADN

<213> Poliovirus JC

<220>

<221> característica_misc

- 20 <222> (1)..(1065)

<223> proteína de la cápsida VP1

<400> 1

```

atggcccca caaaaagaaa aggagaaagg aaggaccccg tgcaagttcc aaaacttctt    60
ataagaggag gagtagaagt tctagaagtt aaaactgggg ttgactcaat tacagaggta    120
gaatgctttt taactccaga aatgggtgac ccagatgagc atcttagggg ttttagtaag    180
tcaatatcta tatcagatac atttgaaagt gactcccca atagggacat gcttccttgt    240
tacagtgtgg ccagaattcc actaccaat ctaaagagg atctaactg tggaaatata    300
ctcatgtggg aggctgtgac cttaaaaact gaggttatag gggtgacaag tttgatgaat    360
gtgcactcta atgggcaagc aactcatgac aatgggtgcag ggaagccagt gcagggcacc    420
agctttcatt ttttttctgt tgggggggag gctttagaat tacagggggg gctttttaat    480
tacagaacaa agtaccaga tggaacaatt tttccaaaga atgccacagt gcaatctcaa    540
gtcatgaaca cagagcaca ggcgtaacct gataagaaca aagcatatcc tgttgaatgt    600
tgggttcctg atcccaccag aaatgaaaac acaagatatt ttgggacact aacaggagga    660
gaaaatgttc ctccagttct tcatataaca aacactgcc caacagtgtt gcttgatgaa    720
tttggtgttg ggccactttg caaagggtgac aacttatact tgtcagctgt tgatgtctgt    780
ggcatgttta caaacagggtc tggttccag cagtggagag gactctccag atattttaag    840
gtgcagctaa ggaaaaggag ggttaaaaac ccctaccaa tttctttcct tcttactgat    900
ttaattaaca gaaggactcc tagagttgat gggcagccta tgtatggcat ggatgctcaa    960
gtagaggagg ttagagtttt tgaggggaaca gagggagctt caggggaccc agacatgatg   1020
agatacgttg acaaatatgg acagttgcag acaaaaatgc tgtaa                       1065

```

<210> 2

<211> 1065

<212> ADN

5 <213> secuencia sintética

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1065)

<223> proteína de la cápside VP1; codón optimizado

10 <400> 2

```

atgggtccca ccaagcgcaa gggcgagccc aaggaccccc tgcaagtgcc caagctgctg      60
atccgtggtg gtgtcgaggt gctggaagtc aagaccggcg tggactccat taccgaggtg     120
gagtgccttc tcacccccga gatgggtgac cctgacgagc acctgagggg cttctccaag     180
tccatctcca tctccgacac cttcgagtcc gactccccca accgtgacat gctgccctgc     240
tactccgtgg ctcttatccc cctgcccacac ctgaacgagg acctgacttg cggcaacatc     300
ctgatgtggg aggctgtgac cctcaagacc gaggtcatcg gcgtgacttc cctgatgaac     360
gtgcactcca acggccaggc taccacgac aacgggtgctg gcaagcccgt gcagggaacc     420
tccttccact tcttctccgt ggggtggcgag gctctggaac tccagggcgt ggtgttcaac     480
taccgtacca agtaccgccg cggcaccatc ttccccaaga acgctactgt gcagtcccaa     540
gtgatgaaca ccgagcaca ggcttacctg gacaagaaca aggcctaccc cgtggagtgc     600
tgggtgcccc accccacccg taacgagaac acccgttact tcggcaccct gaccggtgga     660
gagaacgtgc ccccgtgct gcacatcacc aacaccgcta ccaccgtgct gctggacgag     720
ttcgggtgctg gtcccctgtg caagggcgac aacctgtacc tgtccgctgt ggacgtgtgc     780
ggcatgttca ccaaccgttc cggttccag cagtggcgtg gcctgtcccg ctacttcaag     840
gtgcagctgc gcaagcgctg tgtgaagaac ccctacccta tctccttcct gctgaccgac     900
ctgatcaacc gtcgtacccc tcgtgtggac ggccagccca tgtacggcat ggacgctcag     960
gtggaagagg tccgcgtgtt cgagggcacc gaggaattgc ccggcgaccc cgacatgatg    1020
cgttacgtgg acaagtacgg ccagctccag accaagatgc tgtaa                        1065

```

<210> 3

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Polioma virus JC

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(354)

<223> proteína de la cápsida VP1

10 <400> 3

ES 2 769 643 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Pro Lys Asp Pro Val Gln Val
1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile

50		55		60											
Ser 65	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser 70	Asp	Ser	Pro	Asn	Arg 75	Asp	Met	Leu	Pro	Cys 80
Tyr	Ser	Val	Ala	Arg 85	Ile	Pro	Leu	Pro	Asn 90	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu 95	Thr
Cys	Gly	Asn	Ile 100	Leu	Met	Trp	Glu	Ala 105	Val	Thr	Leu	Lys	Thr 110	Glu	Val
Ile	Gly	Val 115	Thr	Ser	Leu	Met	Asn 120	Val	His	Ser	Asn	Gly 125	Gln	Ala	Thr
His 130	Asp	Asn	Gly	Ala	Gly	Lys 135	Pro	Val	Gln	Gly	Thr 140	Ser	Phe	His	Phe
Phe 145	Ser	Val	Gly	Gly	Glu 150	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln 155	Gly	Val	Val	Phe	Asn 160
Tyr	Arg	Thr	Lys	Tyr 165	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile 170	Phe	Pro	Lys	Asn	Ala 175	Thr
Val	Gln	Ser	Gln 180	Val	Met	Asn	Thr	Glu 185	His	Lys	Ala	Tyr	Leu 190	Asp	Lys
Asn	Lys	Ala 195	Tyr	Pro	Val	Glu	Cys 200	Trp	Val	Pro	Asp	Pro 205	Thr	Arg	Asn
Glu 210	Asn	Thr	Arg	Tyr	Phe	Gly 215	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly 220	Glu	Asn	Val	Pro
Pro 225	Val	Leu	His	Ile	Thr 230	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr 235	Val	Leu	Leu	Asp	Glu 240
Phe	Gly	Val	Gly	Pro 245	Leu	Cys	Lys	Gly	Asp 250	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser 255	Ala
Val	Asp	Val	Cys 260	Gly	Met	Phe	Thr	Asn 265	Arg	Ser	Gly	Ser	Gln 270	Gln	Trp
Arg	Gly	Leu 275	Ser	Arg	Tyr	Phe	Lys 280	Val	Gln	Leu	Arg	Lys 285	Arg	Arg	Val
Lys 290	Asn	Pro	Tyr	Pro	Ile	Ser 295	Phe	Leu	Leu	Thr	Asp 300	Leu	Ile	Asn	Arg
Arg 305	Thr	Pro	Arg	Val	Asp 310	Gly	Gln	Pro	Met	Tyr 315	Gly	Met	Asp	Ala	Gln 320
Val	Glu	Glu	Val	Arg	Val	Phe	Glu	Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Pro	Gly	Asp

325

330 "

335

Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Lys Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
340 345 350

Met Leu

<210> 4

<211> 1035

<212> ADN

5 <213> Polioma virus JC

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1035)

<223> proteína de la cápside VP2

10 <400> 4

```

atgggtgccg cacttgcaact tttgggggac ctagttgcta ctgtttctga ggctgctgct      60
gccacaggat tttcagtagc tgaaattgct gctggagagg ctgctgctac tatagaagtt      120
gaaattgcat cccttgctac tgtagagggg attacaagta cctctgaggc tatagctgct      180
ataggcctta ctcttgaaac atatgctgta ataactggag ctccgggggc tgtagctggg      240
tttgctgcat tgggttcaaac tgtaactggg ggtagtgcta ttgctcagtt gggatataga      300
ttttttgctg actgggatca taaagtttca acagttgggc tttttcagca gccagctatg      360
gctttacaat tatttaatcc agaagactac tatgatattt tatttcctgg agtgaatgcc      420
tttggttaaca atattcacta tttagatcct agacattggg gcccgtcctt gttctccaca      480
atctcccagg ctttttgga tcttggttaga gatgatttgc cagccttaac ctctcaggaa      540
attcagagaa gaacccaaaa actatttggt gaaagtttag caaggttttt ggaagaaact      600
acttgggcaa tagttaattc accagctaac ttatataatt atatttcaga ctattattct      660
agattgtctc cagttaggcc ctctatggta aggcaagttg cccaaaggga gggaaacctat      720
atttcttttg gccactcata caccctaaagt atagatgatg cagacagcat tcaagaagtt      780
acccaaaggc tagatttaaa aacccctaat gtgcaatctg gtgaatttat agaaagaagt      840
attgcaccag gaggtgcaaa tcaaagatct gctcctcaat ggatgttgcc tttactttta      900
gggttgtagc ggactgtaac acctgctctt gaagcatatg aagatggccc caacaaaaag      960
aaaaggagaa aggaaggacc ccgtgcaagt tccaaaactt cttataagag gaggagtaga     1020
agttctagaa gttaa                                     1035

```

<210> 5

<211> 1062

<212> ADN

<213> secuencia sintética

<221> característica_misc

<222> (1)..(1062)

5 <223> proteína de la cápside VP2-HA incluyendo etiqueta de epítipo de hemaglutinina, codón optimizado
<400> 5

atgggagccg ccctggccct gctgggagat ctggtggcta cagtgtctga agccgccgct	60
gccaccggct tttctgtggc cgaaattgcc gctggcgagg ctgccgccac aatcgagggtg	120
gaaattgcca gcctggccac cgtggaaggc atcaccagca cctctgaagc cattgccgcc	180
atcggcctga ccccgagac atacgctgtg atcactggcg ctccaggcgc cgtggctgga	240
tttgctgctc tgggtgcagac agtgaccggc ggctctgcca ttgctcagct gggctacaga	300
ttcttcgccg actgggacca caagggtgtcc accgtgggcc tgtttcagca gcctgccatg	360
gctctgcagc tgttcaacct cgaggactac tacgacatcc tgttccccgg cgtgaacgcc	420
ttcgtgaaca acatccacta cctggacccc cggcactggg gccctagcct gttctctaca	480
atcagccagg ccttctggaa cctcgtgcgg gacgatctgc ctgccctgac cagccaggaa	540
atccagcggc ggaccagaa actgttcgtg gaaagcctgg cccggttcct ggaagagaca	600
acctgggcca tcgtgaacag ccccgccaac ctgtacaact acatcagcga ctactacagc	660
agactgagcc ccgtgcggcc cagcatggtg cgccagggtg cacagagaga gggcacctat	720
atcagcttcg gccactccta caccagagc atcgacgacg ccgacagcat ccaggaagtg	780
accagagac tggacctgaa aacccccaac gtgcagagcg gcgagttcat cgagagatcc	840
attgcccctg gcggagccaa ccagagatct gccctcagt ggatgctgcc cctgctgctg	900
ggcctgtacg gcacagtgc accagccctg gaagcctacg aggacggccc caacaagaag	960
aagcgccgga aagagggccc tagagccagc agcaagacca gctacaagcg gcggagcaga	1020
agcagcagat cctaccata cgatgttcca gattacgctt ga	1062

<210> 6

<211> 344

10 <212> PRT

<213> Polioma virus JC

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(344)

15 <223> proteína de la cápside VP2

<400> 6

ES 2 769 643 T3

Met Gly Ala Ala Leu Ala Leu Leu Gly Asp Leu Val Ala Thr Val Ser
1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Ala Thr Gly Phe Ser Val Ala Glu Ile Ala Ala Gly
20 25 30

Glu Ala Ala Ala Thr Ile Glu Val Glu Ile Ala Ser Leu Ala Thr Val
35 40 45

Glu Gly Ile Thr Ser Thr Ser Glu Ala Ile Ala Ala Ile Gly Leu Thr

50	55	60
Pro Glu Thr Tyr Ala Val Ile Thr Gly Ala	Pro Gly Ala Val Ala Gly	
65	70	75
Phe Ala Ala Leu Val Gln Thr Val Thr Gly Gly Ser Ala Ile Ala Gln		
	85	90
Leu Gly Tyr Arg Phe Phe Ala Asp Trp Asp His Lys Val Ser Thr Val		
	100	105
Gly Leu Phe Gln Gln Pro Ala Met Ala Leu Gln Leu Phe Asn Pro Glu		
	115	120
Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Phe Pro Gly Val Asn Ala Phe Val Asn Asn		
	130	135
Ile His Tyr Leu Asp Pro Arg His Trp Gly Pro Ser Leu Phe Ser Thr		
	145	150
Ile Ser Gln Ala Phe Trp Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Pro Ala Leu		
	165	170
Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg Arg Thr Gln Lys Leu Phe Val Glu Ser		
	180	185
Leu Ala Arg Phe Leu Glu Glu Thr Thr Trp Ala Ile Val Asn Ser Pro		
	195	200
Ala Asn Leu Tyr Asn Tyr Ile Ser Asp Tyr Tyr Ser Arg Leu Ser Pro		
	210	215
Val Arg Pro Ser Met Val Arg Gln Val Ala Gln Arg Glu Gly Thr Tyr		
	225	230
Ile Ser Phe Gly His Ser Tyr Thr Gln Ser Ile Asp Asp Ala Asp Ser		
	245	250
Ile Gln Glu Val Thr Gln Arg Leu Asp Leu Lys Thr Pro Asn Val Gln		
	260	265
Ser Gly Glu Phe Ile Glu Arg Ser Ile Ala Pro Gly Gly Ala Asn Gln		
	275	280
Arg Ser Ala Pro Gln Trp Met Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Tyr Gly		
	290	295
Thr Val Thr Pro Ala Leu Glu Ala Tyr Glu Asp Gly Pro Asn Lys Lys		
	305	310
Lys Arg Arg Lys Glu Gly Pro Arg Ala Ser Ser Lys Thr Ser Tyr Lys		

325

330

335

Arg Arg Ser Arg Ser Ser Arg Ser
340

<210> 7

<211> 234

<212> PRT

5 <213> secuencia sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(234)

<223> proteína de la cápside VP2-HA incluyendo etiqueta de epítipo de hemaglutinina C-terminal, codón optimizado

10 <400> 7

Met Gly Ala Ala Leu Ala Leu Leu Gly Asp Leu Val Ala Thr Val Ser
1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Thr Gly Phe Ser Val Ala Glu Ile Ala Ala Gly
20 25 30

Glu Ala Ala Ala Thr Ile Glu Val Glu Ile Ala Ser Leu Ala Thr Val
35 40 45

Glu Gly Ile Thr Ser Thr Ser Glu Ala Ile Ala Ala Ile Gly Leu Thr
50 55 60

Pro Glu Thr Tyr Ala Val Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ala Val Ala Gly
65 70 75 80

Phe Ala Ala Leu Val Gln Thr Val Thr Gly Gly Ser Ala Ile Ala Gln
85 90 95

Leu Gly Tyr Arg Phe Phe Ala Asp Trp Asp His Lys Val Ser Thr Val
100 105 110

Gly Leu Phe Gln Gln Pro Ala Met Ala Leu Gln Leu Phe Asn Pro Glu
115 120 125

Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Phe Pro Gly Val Asn Ala Phe Val Asn Asn
130 135 140

Ile His Tyr Leu Asp Pro Arg His Trp Gly Pro Ser Leu Phe Ser Thr
145 150 155 160

Ile Ser Gln Ala Phe Trp Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Pro Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg Arg Thr Gln Lys Leu Phe Val Glu Ser
180 185 190

Leu Ala Arg Phe Leu Glu Glu Thr Thr Trp Ala Ile Val Asn Ser Pro
195 200 205

Ala Asn Leu Tyr Asn Tyr Ile Ser Asp Tyr Tyr Ser Arg Leu Ser Pro
210 215 220

Val Arg Pro Ser Met Val Arg Gln Val Ala
225 230

<210> 8

<211> 678

<212> ADN

<213> Polioma virus JC

<220>

<221> característica_misc

5 <222> (1)..(678)

<223> proteína de la cápside VP3

<400> 8

```

atggcctttac aattatttaa tccagaagac tactatgata ttttatttcc tggagtgaat      60
gcctttgtta acaatattca ctatttagat cctagacatt ggggcccgtc cttgttctcc      120
acaatctccc aggctttttg gaatcttggt agagatgatt tgccagcctt aacctctcag      180
gaaattcaga gaagaacca aaaactatgt gttgaaagtt tagcaagggt tttggaagaa      240
actacttggg caatagttaa ttcaccagct aacttatata attatatttc agactattat      300
tctagattgt ctccagttag gccctctatg gtaaggcaag ttgcccaaag ggaggggaacc      360
tatatttctt ttggccactc atacacccaa agtatagatg atgcagacag cattcaagaa      420
gttaccctaaa ggctagattt aaaaacccca aatgtgcaat ctggtgaatt tatagaaaga      480
agtattgcac caggagggtgc aaatcaaaga tctgctcctc aatggatggt gcctttactt      540
ttaggggtgt acgggactgt aacacctgct cttgaagcat atgaagatgg cccaacaaa      600
aagaaaagga gaaaggaagg accccgtgca agttccaaaa cttcttataa gaggaggagt      660
agaagttcta gaagttaa

```

<210> 9

10 <211> 705

<212> ADN

<213> secuencia sintética

<220>

<221> característica_misc

15 <222> (1)..(705)

<223> proteína de la cápside VP3-HA que incluye etiqueta de epítipo de hemaglutinina, codón optimizado

<400> 9

atggctctgc agctgttcaa ccccgaggac tactacgaca tcctgttccc cggcgtgaac	60
gccttcgtga acaacatcca ctacctggac ccccggcact ggggccctag cctgttctct	120
acaatcagcc aggccttctg gaacctcgtg cgggacgatc tgctgccct gaccagccag	180
gaaatccagc ggcggaccca gaaactgttc gtggaaagcc tggcccgggt cctggaagag	240
acaacctggg ccatcgtgaa cagccccgcc aacctgtaca actacatcag cgactactac	300
agcagactga gccccgtgcg gcccgatg gtgcccagg tggcacagag agagggcacc	360
tatatcagct tcggccactc ctacacccag agcatcgac acgccgacag catccaggaa	420
gtgaccaga gactggacct gaaaaccccc aacgtgcaga gcggcgagtt catcgagaga	480
tccattgccc ctggcggagc caaccagaga tctgcccctc agtggatgct gccctgctg	540
ctgggcctgt acggcacagt gacaccagcc ctggaagcct acgaggacgg cccaacaag	600
aagaagcgcc ggaaagaggg ccctagagcc agcagcaaga ccagctacaa gcggcggagc	660
agaagcagca gacctaacc atacgatgtt ccagattacg ctga	705

<210> 10

<211> 225

<212> PRT

5 <213> polyoma virus JC

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(225)

<223> proteína de la cápside VP3

10 <400> 10

Met Ala Leu Gln Leu Phe Asn Pro Glu Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Phe
 1 5 10 15
 Pro Gly Val Asn Ala Phe Val Asn Asn Ile His Tyr Leu Asp Pro Arg
 20 25 30
 His Trp Gly Pro Ser Leu Phe Ser Thr Ile Ser Gln Ala Phe Trp Asn
 35 40 45
 Leu Val Arg Asp Asp Leu Pro Ala Leu Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg
 50 55 60
 Arg Thr Gln Lys Leu Phe Val Glu Ser Leu Ala Arg Phe Leu Glu Glu
 65 70 75 80
 Thr Thr Trp Ala Ile Val Asn Ser Pro Ala Asn Leu Tyr Asn Tyr Ile
 85 90 95
 Ser Asp Tyr Tyr Ser Arg Leu Ser Pro Val Arg Pro Ser Met Val Arg
 100 105 110
 Gln Val Ala Gln Arg Glu Gly Thr Tyr Ile Ser Phe Gly His Ser Tyr
 115 120 125
 Thr Gln Ser Ile Asp Asp Ala Asp Ser Ile Gln Glu Val Thr Gln Arg
 130 135 140
 Leu Asp Leu Lys Thr Pro Asn Val Gln Ser Gly Glu Phe Ile Glu Arg
 145 150 155 160
 Ser Ile Ala Pro Gly Gly Ala Asn Gln Arg Ser Ala Pro Gln Trp Met
 165 170 175
 Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Tyr Gly Thr Val Thr Pro Ala Leu Glu
 180 185 190
 Ala Tyr Glu Asp Gly Pro Asn Lys Lys Lys Arg Arg Lys Glu Gly Pro
 195 200 205
 Arg Ala Ser Ser Lys Thr Ser Tyr Lys Arg Arg Ser Arg Ser Ser Arg
 210 215 220
 Ser
 225

<210> 11

<211> 234

<212> PRT

<213> secuencia sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

5 <222> (1)..(234)

<223> proteína de la cápside VP3-HA que incluye etiqueta de epítipo de hemaglutinina C-terminal, codón optimizado

<400> 11

Met Ala Leu Gln Leu Phe Asn Pro Glu Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Phe
 1 5 10 15
 Pro Gly Val Asn Ala Phe Val Asn Asn Ile His Tyr Leu Asp Pro Arg
 20 25 30
 His Trp Gly Pro Ser Leu Phe Ser Thr Ile Ser Gln Ala Phe Trp Asn
 35 40 45
 Leu Val Arg Asp Asp Leu Pro Ala Leu Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg
 50 55 60
 Arg Thr Gln Lys Leu Phe Val Glu Ser Leu Ala Arg Phe Leu Glu Glu
 65 70 75 80
 Thr Thr Trp Ala Ile Val Asn Ser Pro Ala Asn Leu Tyr Asn Tyr Ile
 85 90 95
 Ser Asp Tyr Tyr Ser Arg Leu Ser Pro Val Arg Pro Ser Met Val Arg
 100 105 110
 Gln Val Ala Gln Arg Glu Gly Thr Tyr Ile Ser Phe Gly His Ser Tyr
 115 120 125
 Thr Gln Ser Ile Asp Asp Ala Asp Ser Ile Gln Glu Val Thr Gln Arg
 130 135 140
 Leu Asp Leu Lys Thr Pro Asn Val Gln Ser Gly Glu Phe Ile Glu Arg
 145 150 155 160
 Ser Ile Ala Pro Gly Gly Ala Asn Gln Arg Ser Ala Pro Gln Trp Met
 165 170 175
 Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Tyr Gly Thr Val Thr Pro Ala Leu Glu
 180 185 190
 Ala Tyr Glu Asp Gly Pro Asn Lys Lys Lys Arg Arg Lys Glu Gly Pro
 195 200 205
 Arg Ala Ser Ser Lys Thr Ser Tyr Lys Arg Arg Ser Arg Ser Ser Arg
 210 215 220
 Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 225 230

<210> 12

<211> 1596

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

<220>

<221> característica_misc

5 <222> (1)..(1596)

<223> proteína de la cápside L1

<400> 12

```

atgcagggtga cttttattta catcctagtt attacatggt acgaaaacga cgtaaacggt      60
taccatatttt tttttcagat gtctcttttg ctgcctagtg aggccactgt ctacttgcct      120
cctgtcccag tatctaaggt tgtaagcacg gatgaatatg ttgcacgcac aaacatatat      180
tatcatgcag gaacatccag actacttgca gttggacatc cctattttcc tattaataaaa      240
cctaacaata acaaaatatt agttcctaaa gtatcaggat tacaatacag ggtatttaga      300
atacatttac ctgaccccaa taagtttggt tttcctgaca cctcatttta taatccagat      360
acacagcggc tggtttgggc ctgtgtaggt gttgaggtag gtcgtggtca gccattaggt      420
gtgggcatta gtggccatcc tttattaaat aaattggatg acacagaaaa tgctagtgt      480
tatgcagcaa atgcagggtg ggataataga gaatgtatat ctatggatta caaacaacaa      540
caattgtgtt taattgggtg caaacacct ataggggaac actggggcaa aggatcccca      600
tgtaccaatg ttgcagtaaa tccagggtgat tgtccaccat tagagttaat aaacacagtt      660
attcaggatg gtgatatggt tgatactggc tttggtgcta tggactttac tacattacag      720
gctaacaaaa gtgaagttcc actggatatt tgtacatcta tttgcaaata tccagattat      780

atataaatgg tgtcagaacc atatggcgac agcttatttt tttatttacg aagggaacaa      840
atgtttgtta gacatttatt taatagggct ggtgctgttg gtgaaaatgt accagacgat      900
ttatacatta aaggctctgg gtctactgca aatttagcca gttcaaatta tttcctaca      960
cctagtgggt ctatggttac ctctgatgcc caaatattca ataaacctta ttggttacaa     1020
cgagcacagg gccacaataa tggcatttgt tggggtaacc aactatttgt tactgttgtt     1080
gatactacac gcagtacaaa tatgtcatta tgtgtgcca tatctacttc agaaactaca     1140
tataaaaata ctaactttaa ggagtaccta cgacatgggg aggaatatga tttacagttt     1200
atTTTTcaac tgtgcaaaat aaccttaact gcagacgtta tgacatacat acattctatg     1260
aattccacta ttttggagga ctggaatttt ggtctacaac ctccccagg aggcacacta     1320
gaagatactt ataggtttgt aacatcccag gcaattgctt gtcaaaaaca tacacctcca     1380
gcacctaaag aagatcccct taaaaaatac actttttggg aagtaaattt aaaggaaaag     1440
ttttctgcag acctagatca gtttccttta ggacgcaaat ttttactaca agcaggattg     1500
aaggccaaac caaaatttac attaggaaaa cgaaaagcta caccaccac ctcactacc     1560
tctacaactg ctaaacgcaa aaaacgtaag ctgtaa                                1596

```

<210> 13

<211> 531

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(531)

<223> proteína de la cápside L1

<400> 13

Met Gln Val Thr Phe Ile Tyr Ile Leu Val Ile Thr Cys Tyr Glu Asn
1 5 10 15

Asp Val Asn Val Tyr His Ile Phe Phe Gln Met Ser Leu Trp Leu Pro
20 25 30

Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser Lys Val Val
35 40 45

Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr His Ala Gly
50 55 60

Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Pro Ile Lys Lys
65 70 75 80

Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly Leu Gln Tyr
85 90 95

10 Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Gly Phe Pro

100							105							110						
Asp	Thr	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro	Asp	Thr	Gln	Arg	Leu	Val	Trp	Ala	Cys					
		115					120					125								
Val	Gly	Val	Glu	Val	Gly	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Ser					
	130					135					140									
Gly	His	Pro	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Asp	Asp	Thr	Glu	Asn	Ala	Ser	Ala					
145					150					155					160					
Tyr	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Val	Asp	Asn	Arg	Glu	Cys	Ile	Ser	Met	Asp					
				165					170					175						
Tyr	Lys	Gln	Thr	Gln	Leu	Cys	Leu	Ile	Gly	Cys	Lys	Pro	Pro	Ile	Gly					
			180					185					190							
Glu	His	Trp	Gly	Lys	Gly	Ser	Pro	Cys	Thr	Asn	Val	Ala	Val	Asn	Pro					
		195					200					205								
Gly	Asp	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr	Val	Ile	Gln	Asp	Gly					
	210					215					220									
Asp	Met	Val	Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Ala	Met	Asp	Phe	Thr	Thr	Leu	Gln					
225					230					235					240					
Ala	Asn	Lys	Ser	Glu	Val	Pro	Leu	Asp	Ile	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Lys					
				245					250					255						
Tyr	Pro	Asp	Tyr	Ile	Lys	Met	Val	Ser	Glu	Pro	Tyr	Gly	Asp	Ser	Leu					
			260					265					270							
Phe	Phe	Tyr	Leu	Arg	Arg	Glu	Gln	Met	Phe	Val	Arg	His	Leu	Phe	Asn					
		275					280					285								
Arg	Ala	Gly	Ala	Val	Gly	Glu	Asn	Val	Pro	Asp	Asp	Leu	Tyr	Ile	Lys					
	290					295					300									
Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Asn	Leu	Ala	Ser	Ser	Asn	Tyr	Phe	Pro	Thr					
305					310					315					320					
Pro	Ser	Gly	Ser	Met	Val	Thr	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Phe	Asn	Lys	Pro					
				325					330					335						
Tyr	Trp	Leu	Gln	Arg	Ala	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Gly	Ile	Cys	Trp	Gly					
			340					345					350							
Asn	Gln	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	Asn	Met					
		355					360					365								
Ser	Leu	Cys	Ala	Ala	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Lys	Asn	Thr					

370 375 380

Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe
385 390 395 400

Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Val Met Thr Tyr
405 410 415

Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu
420 425 430

Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val Thr
435 440 445

Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala Pro Lys Glu
450 455 460

Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys
465 470 475 480

Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu
485 490 495

Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly Lys Arg Lys
500 505 510

Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys Arg Lys Lys
515 520 525

Arg Lys Leu
530

<210> 14

<211> 1422

<212> ADN

5 <213> Virus del papiloma humano tipo 16

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1422)

<223> proteína de la cápside L2

10 <400> 14

atgcgacaca aacgttctgc aaaacgcaca aaacgtgcat cggctaccca actttataaa	60
acatgcaaac aggcaggtag atgtccacct gacattatac ctaagggtga aggcaaaact	120
attgctgata aaatattaca atatggaagt atgggtgtat tttttggtgg gtttaggaatt	180
ggaacagggg cgggtacagg cggacgcact gggatatatt cattgggaac aaggcctccc	240
acagctacag atacacttgc tcctgtaaga ccccttttaa cagtagatcc tgtgggccct	300
tctgatacct ctatagtttc tttagtggaa gaaactagtt ttattgatgc tgggtgcacca	360
acatctgtac cttccattcc cccagatgta tcaggattta gtattactac ttcaactgat	420
accacacctg ctatattaga tattaataat actgttacta ctgttactac acataataat	480
cccactttca ctgacctatc tgtattgcag cctccaacac ctgcagaaac tggagggcat	540
tttacctttt catcatccac tattagtaca cataattatg aagaaattcc tatggatata	600
tttattgtta gcacaaacct taacacagta actagtagca caccatacc agggctctgc	660
ccagtggcac gcctaggatt atatagtcgc acaacacaac aagttaaagt ttagtagacct	720
gcttttgtaa ccaactccac taaacttatt acatatgata atcctgcata tgaaggatata	780
gatgtggata atacattata tttttctagt aatgataata gtattaatat agctccagat	840
cctgactttt tggatatagt tgctttacat aggccagcat taacctctag gcgtactggc	900
attaggtaca gtagaattgg taataaaca acactacgta ctgtagtgga aaaatctata	960
gggtgctaagg tacattatta ttatgatttt agtactattg atcctgcaga agaaatagaa	1020
ttacaaacta taacaccttc tacatatact accacttcac atgcagcctc acctacttct	1080
attaataatg gattatatga tttttatgca gatgacttta ttacagatac ttctacaacc	1140
ccggtaccat ctgtaccctc tacatcttta tcagggtata ttcctgcaaa tacaacaatt	1200
ccttttggtg gtgcatacaa tattccttta gtatcagggt ctgatatacc cattaatata	1260
actgaccaag ctccttcatt aattcctata gttccagggt ctccacaata tacaattatt	1320
gctgatgcag gtgactttta tttacatcct agttattaca tgttacgaaa acgacgtaaa	1380
cgtttaccat attttttttc agatgtctct ttggctgcct ag	1422

<210> 15

<211> 473

<212> PRT

5 <213> Virus del papiloma humano tipo 16

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(473)

<223> proteína de la cápside L2

10 <400> 15

ES 2 769 643 T3

Met	Arg	His	Lys	Arg	Ser	Ala	Lys	Arg	Thr	Lys	Arg	Ala	Ser	Ala	Thr
1				5					10					15	
Gln	Leu	Tyr	Lys	Thr	Cys	Lys	Gln	Ala	Gly	Thr	Cys	Pro	Pro	Asp	Ile
			20					25					30		
Ile	Pro	Lys	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	Ile	Ala	Asp	Gln	Ile	Leu	Gln	Tyr
		35					40					45			
Gly	Ser	Met	Gly	Val	Phe	Phe	Gly	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Thr	Gly	Gly	Arg	Thr	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu	Gly	Thr	Arg	Pro	Pro
65					70					75					80

Thr Ala Thr Asp Thr Leu Ala Pro Val Arg Pro Pro Leu Thr Val Asp
 85 90 95
 Pro Val Gly Pro Ser Asp Pro Ser Ile Val Ser Leu Val Glu Glu Thr
 100 105 110
 Ser Phe Ile Asp Ala Gly Ala Pro Thr Ser Val Pro Ser Ile Pro Pro
 115 120 125
 Asp Val Ser Gly Phe Ser Ile Thr Thr Ser Thr Asp Thr Thr Pro Ala
 130 135 140
 Ile Leu Asp Ile Asn Asn Thr Val Thr Thr Val Thr Thr His Asn Asn
 145 150 155 160
 Pro Thr Phe Thr Asp Pro Ser Val Leu Gln Pro Pro Thr Pro Ala Glu
 165 170 175
 Thr Gly Gly His Phe Thr Leu Ser Ser Ser Thr Ile Ser Thr His Asn
 180 185 190
 Tyr Glu Glu Ile Pro Met Asp Thr Phe Ile Val Ser Thr Asn Pro Asn
 195 200 205
 Thr Val Thr Ser Ser Thr Pro Ile Pro Gly Ser Arg Pro Val Ala Arg
 210 215 220
 Leu Gly Leu Tyr Ser Arg Thr Thr Gln Gln Val Lys Val Val Asp Pro
 225 230 235 240
 Ala Phe Val Thr Thr Pro Thr Lys Leu Ile Thr Tyr Asp Asn Pro Ala
 245 250 255
 Tyr Glu Gly Ile Asp Val Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ser Ser Asn Asp
 260 265 270
 Asn Ser Ile Asn Ile Ala Pro Asp Pro Asp Phe Leu Asp Ile Val Ala
 275 280 285
 Leu His Arg Pro Ala Leu Thr Ser Arg Arg Thr Gly Ile Arg Tyr Ser
 290 295 300
 Arg Ile Gly Asn Lys Gln Thr Leu Arg Thr Arg Ser Gly Lys Ser Ile
 305 310 315 320
 Gly Ala Lys Val His Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ser Thr Ile Asp Pro Ala
 325 330 335
 Glu Glu Ile Glu Leu Gln Thr Ile Thr Pro Ser Thr Tyr Thr Thr Thr
 340 345 350

Ser His Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ile Asn Asn Gly Leu Tyr Asp Ile
355 360 365

Tyr Ala Asp Asp Phe Ile Thr Asp Thr Ser Thr Thr Pro Val Pro Ser
370 375 380

Val Pro Ser Thr Ser Leu Ser Gly Tyr Ile Pro Ala Asn Thr Thr Ile
385 390 395 400

Pro Phe Gly Gly Ala Tyr Asn Ile Pro Leu Val Ser Gly Pro Asp Ile
405 410 415

Pro Ile Asn Ile Thr Asp Gln Ala Pro Ser Leu Ile Pro Ile Val Pro
420 425 430

Gly Ser Pro Gln Tyr Thr Ile Ile Ala Asp Ala Gly Asp Phe Tyr Leu
435 440 445

His Pro Ser Tyr Tyr Met Leu Arg Lys Arg Arg Lys Arg Leu Pro Tyr
450 455 460

Phe Phe Ser Asp Val Ser Leu Ala Ala
465 470

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de partículas similares a virus (VLP), caracterizado porque se filtra una composición que contiene VLP por un medio filtrante con un límite de exclusión de más de 30 kDa a 1500 kDa, en cuyo caso como composición que contiene VLP se usa el sobrenadante del cultivo de las células que expresan VLP
- 5 (sobrenadante de cultivo celular), en donde las VLP se componen de la proteína estructural VP1 del virus JC humano y con la filtración se efectúa al mismo tiempo una reamortiguación de pH) de la composición que contiene VLP.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde el medio filtrante presenta un límite de exclusión de más de 30 kDa a 100 kDa.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en donde al filtrar se desarrolla una diferencia de presión entre 0,5 bares y 10 bares, preferiblemente entre 0,5 y 5 bares y de modo particularmente preferido entre 0,5 bares y 3 bares.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en donde al reamortiguar el pH desciende a un valor entre 5,0 y 8,0.
- 15 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en donde la filtración se realiza como filtración de flujo cruzado (crossflow).
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en donde la filtración de flujo cruzado genera una corriente transversal de 2,5 a 3 m/s que fluye a lo largo del medio de filtro.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en donde con la filtración al mismo tiempo se efectúa una concentración de la composición que contiene VLP.
- 20 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el sobrenadante de cultivo celular se centrifuga antes de la filtración, pero no se trata de modo enzimático o químico, o se somete a cromatografía.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en donde las VLP se someten adicionalmente a las siguientes etapas:
 - (a) Disociación de las VLP;
 - 25 (b) purificación de las VLP disociadas;
 - (c) Reasociación de las VLP.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque, después de la filtración, la composición que contiene VLP se purifica adicionalmente mediante cromatografía, de preferencia mediante cromatografía de intercambio aniónico.
- 30 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la VLP presenta la proteína estructural VP1 con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos según SEQ. ID. NO:1 o SEQ. ID. NO:2.

Figura 1

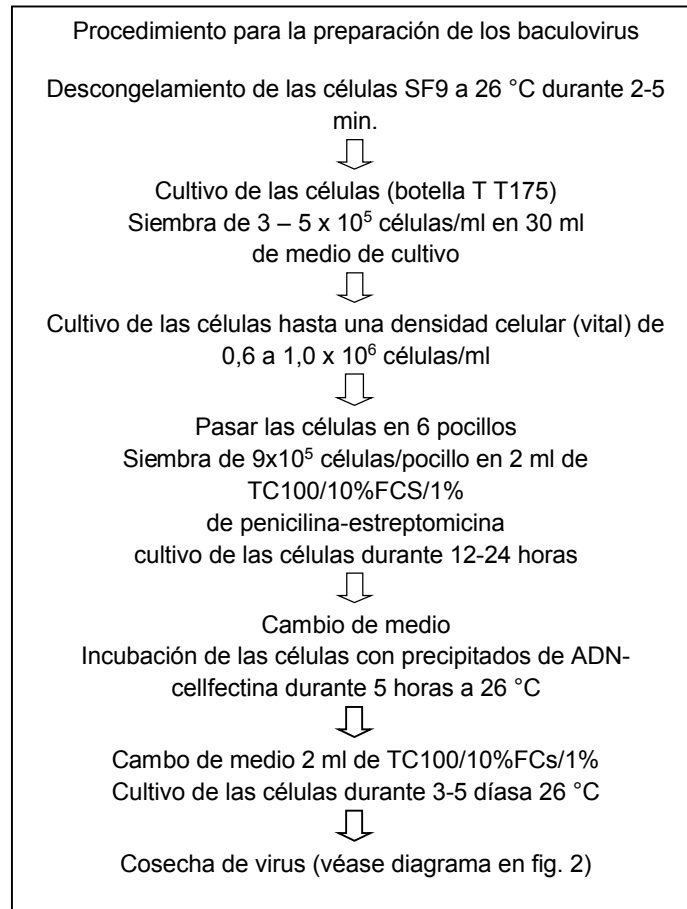


Figura 2

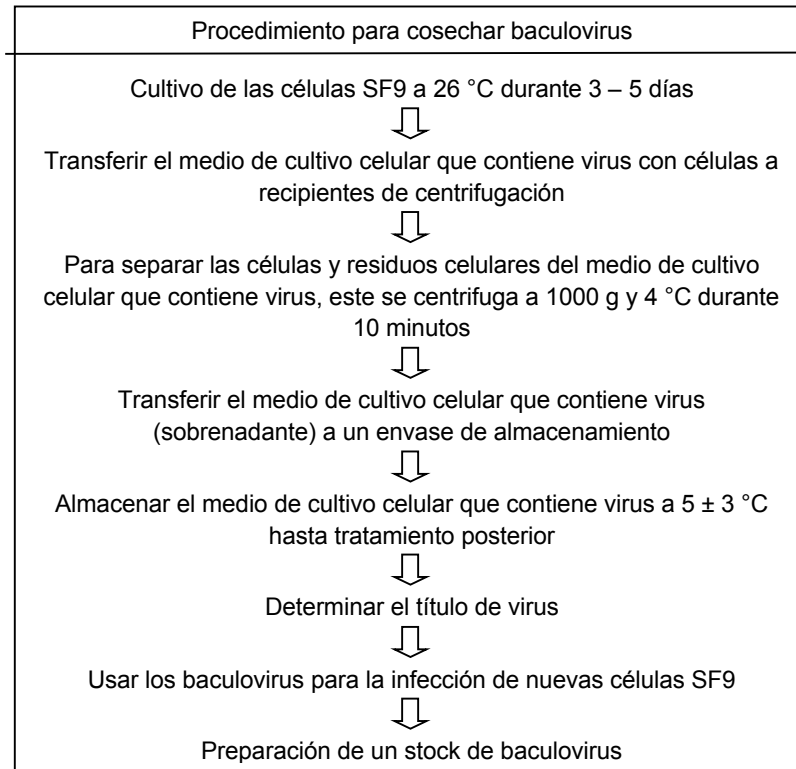


Figura 3

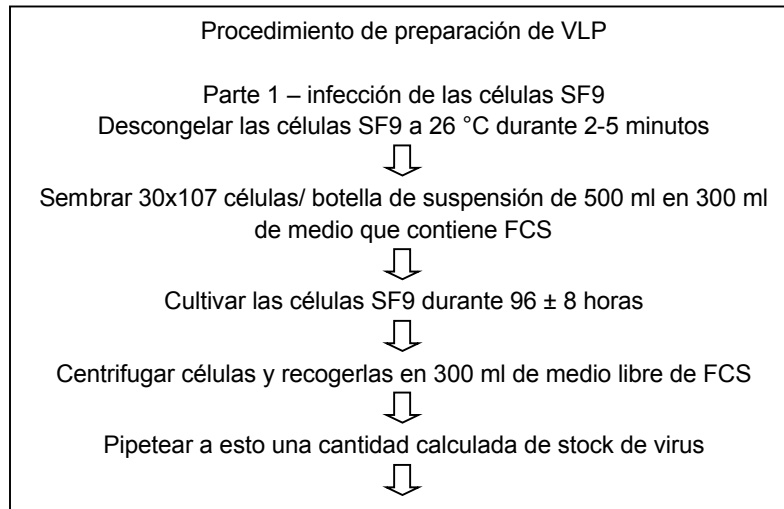


Figura 4

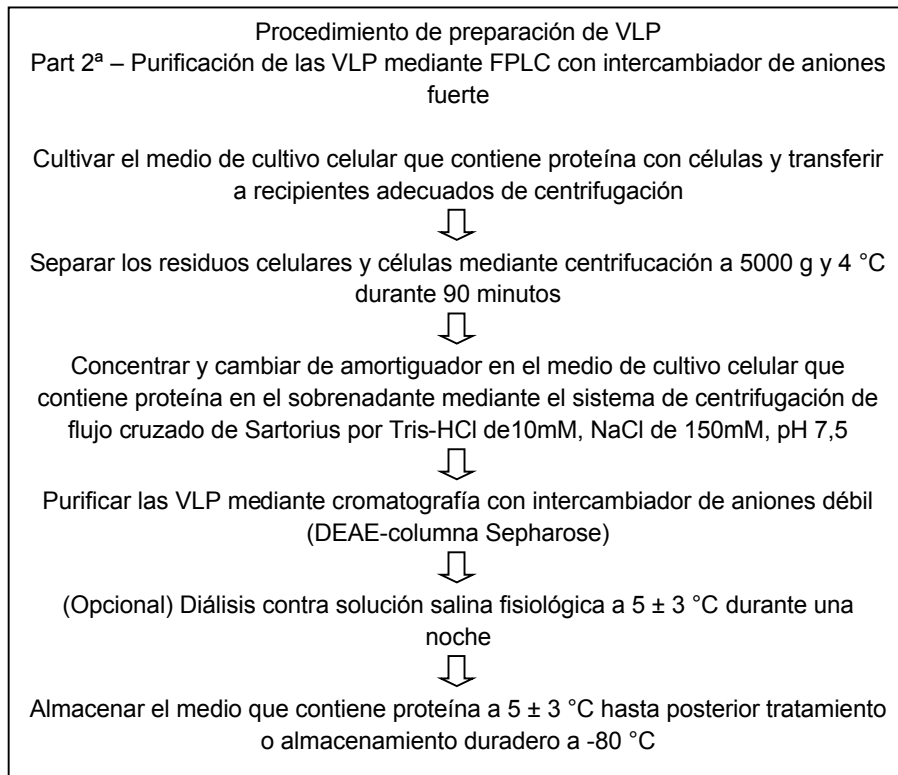


Figura 5

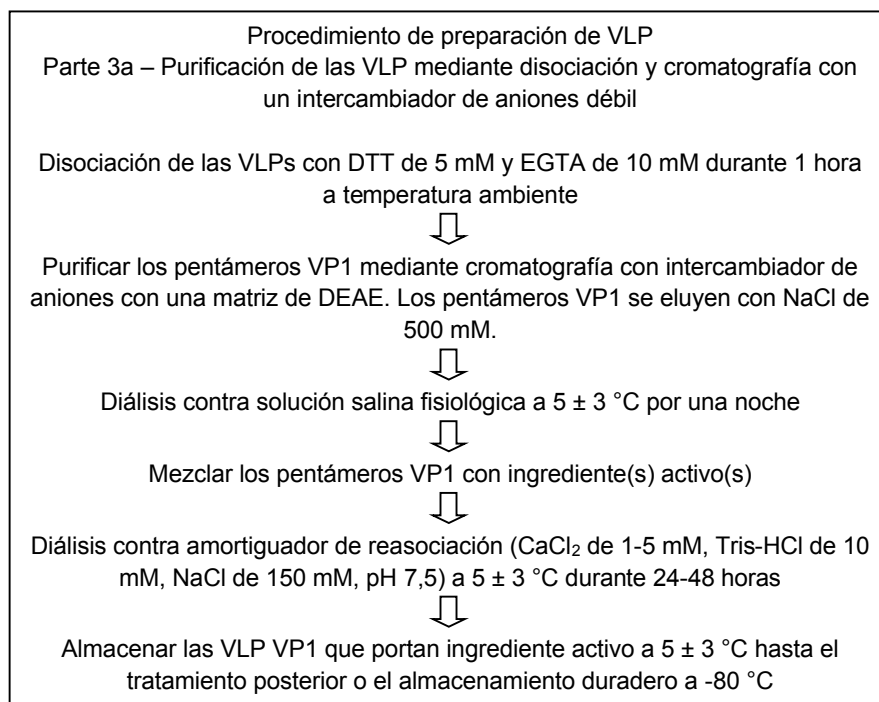


Figura 6

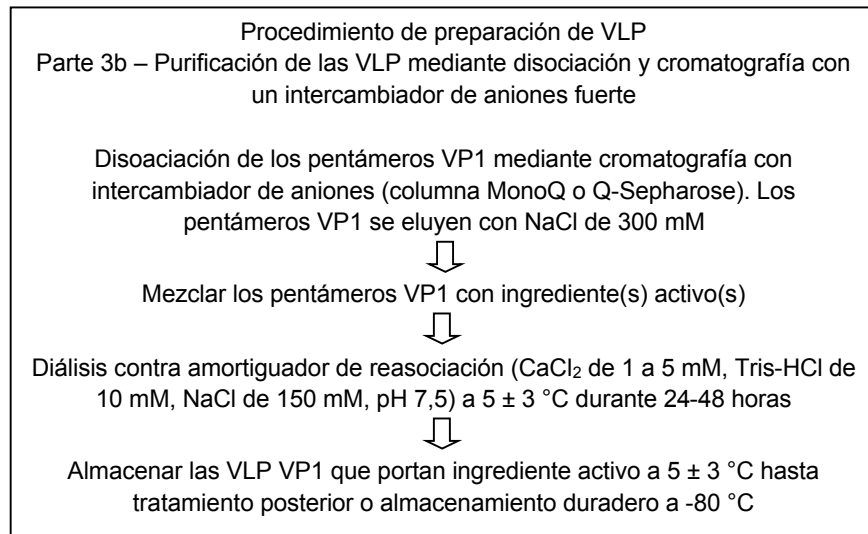


Figura 7

1 CCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCCGCCACCAT M

61 GCTCCCACCAAGCGCAAGGGCGAGCCCAAGGACCCCGTGCAAGTGCCCAAGCTGCTGATC
A P T K R K G E P K D P V Q V P K L L I

121 CGTGGTGGTGTCTGAGGTGCTGGAAGTCAAGACCGGCGTGGACTCCATTACCGAGGTGGAG
R G G V E V L E V K T G V D S I T E V E

181 TGCTTCCTCACCCCGAGATGGGTGACCCTGACGAGCACCTGAGGGGCTTCTCCAAGTCC
C F L T P E M G D P D E H L R G F S K S

241 ATCTCCATCTCCGACACCTTCGAGTCCGACTCCCCCAACCGTGACATGCTGCCCTGCTAC
I S I S D T F E S D S P N R D M L P C Y

301 TCCGTGGCTCGTATCCCCCTGCCCAACCTGAACGAGGACCTGACTTGCGGCAACATCCTG
S V A R I P L P N L N E D L T C G N I L

361 ATGTGGGAGGCTGTGACCCTCAAGACCGAGGTCATCGGCGTGACTTCCCTGATGAACGTG
M W E A V T L K T E V I G V T S L M N V

421 CACTCCAACGGCCAGGCTACCCACGACAACGGTGCTGGCAAGCCCGTGACAGGGAACCTCC
H S N G Q A T H D N G A G K P V Q G T S

481 TTCCACTTCTTCTCCGTGGGTGGCGAGGCTCTGGAAGTCCAGGGCGTGGTGTTCAACTAC
F H F F S V G G E A L E L Q G V V F N Y

541 CGTACCAAGTACCCCGACGGCACCATCTTCCCCAAGAACGCTACTGTGCAGTCCCAAGTG
R T K Y P D G T I F P K N A T V Q S Q V

601 ATGAACACCGAGCACAAGGCTTACCTGGACAAGAACAAGGCCTACCCCGTGGAGTGCTGG
M N T E H K A Y L D K N K A Y P V E C W

661 GTGCCCCGACCCACCCGTAACGAGAACACCCGTTACTTCCGACCCCTGACCGGTGGAGAG
V P D P T R N E N T R Y F G T L T G G E

721 AACGTGCCCCCGTGTGTCACATCACCAACACCGCTACCACCGTGCTGCTGGACGAGTTC
N V P P V L H I T N T A T T V L L D E F

781 GGTGTCCGTCCCCTGTGCAAGGGCGACAACCTGTACCTGTCCGCTGTGGACGTGTGCGGC
G V G P L C K G D N L Y L S A V D V C G

841 ATGTTACCAACCGTTCCGGTTCACAGCAGTGGCGTGGCCTGTCCCGCTACTTCAAGGTG
M F T N R S G S Q Q W R G L S R Y F K V

901 CAGCTGCGCAAGCGTCGTGTGAAGAACCCCTACCCTATCTCCTTCCTGCTGACCGACCTG
Q L R K R R V K N P Y P I S F L L T D L

961 ATCAACCGTCGTACCCCTCGTGTGGACGGCCAGCCCATGTACGGCATGGACGCTCAGGTG
I N R R T P R V D G Q P M Y G M D A Q V

1021 GAAGAGGTCCGCGTGTTCGAGGGCACCGAGGAATTGCCCGGCGACCCCGACATGATGCGT
E E V R V F E G T E E L P G D P D M M R

1081 TACGTGGACAAGTACGGCCAGCTCCAGACCAAGATGCTGTAAGTGCAGTCTCGAGGCATG
Y V D K Y G Q L Q T K M L *