

DESARROLLO DE UNA VACUNA PROFILACTICA DE SEGUNDA GENERACION CONTRA EL PAPILOMAVIRUS HUMANO

ALONSO LEONARDO¹, MARIA LAURA CERUTTI¹, MARIKENA RISSO¹, MARIANGELES GONZALEZ¹,
GABRIELA CAMPOREALE², GONZALO DE PRAT GAY²¹XBio S.A., ²Fundación Instituto Leloir-CONICET, Buenos Aires

Resumen Los papilomavirus humanos (HPV) son el agente etiológico del cáncer cervical (CC), la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. Se estima que medio millón de nuevos cánceres se diagnostica cada año, ocurriendo la mayoría de ellos en países en vías de desarrollo debido a la ausencia o ineficiencia de los programas masivos de detección temprana. Recientemente se han introducido en el mercado dos vacunas profilácticas contra las principales cepas oncogénicas de HPV, la cepa 16 y 18, responsables por el 80% de todos los CC. Estas vacunas se obtienen en forma recombinante y han demostrado ser extremadamente seguras y eficaces. Sin embargo, su impacto inmediato en la incidencia de la infección por HPV en países en vías de desarrollo será mínimo, debido principalmente al alto costo de las mismas. Existe la necesidad de contar con vacunas de segunda generación, de bajo costo y de aplicación masiva que permitan disminuir sensiblemente el número de CC en la población. Con este objetivo hemos desarrollado una plataforma de expresión recombinante que permite obtener partículas tipo virus (VLPs) con las cuales es posible formular vacunas efectivas y accesibles contra la infección por HPV.

Palabras clave: papilomavirus, cáncer cervical, vacuna profiláctica

Abstract *Development of a second generation prophylactic vaccine against human papillomavirus.*

Human papillomaviruses (HPV) are the etiologic agent for cervical cancer (CC), the second cause of cancer death in women worldwide. It is estimated that half a million new cases are diagnosed each year, mostly in developing countries due to the lack of massive programs for early detection of the virus. Recently, two prophylactic vaccines against the main oncogenic HPV types 16 and 18 (responsible for 80% of CC) have been introduced into market. Both of these vaccines, obtained as recombinants, have been shown to be safe and effective; however, their high cost works against its immediate impact in the incidence of HPV infection in developing and low-income countries. There is a need to have in hand second generation, low cost vaccines of massive use that will decrease CC cases in a large extent. With this in mind, we have developed a recombinant expression platform that allows us to obtain virus-like particles (VLPs) to formulate both effective and accessible vaccines against HPV infection.

Key words: papillomavirus, cervical cancer, prophylactic vaccine

El papilomavirus humano

La etiología infecciosa de las diversas enfermedades cutáneas benignas en humanos y animales se presumía desde fines del siglo XIX. Su naturaleza viral fue propuesta en 1907 por Ciuffo¹. No obstante, como en la mayoría de los casos que involucran virus, estas sospechas fueron confirmadas mucho más tarde, en 1949, por microscopía electrónica².

El papilomavirus humano (HPV) infecta células epiteliales y, de acuerdo al tipo de tejido y estado de diferen-

ciación, puede inducir lesiones crónicas o aquellas que dan lugar a transformación celular. Se han identificado cerca de 200 tipos virales diferentes, clasificados en 16 grupos, de los cuales hay 85 tipos con su genoma ya secuenciado³. Se distinguen dos grandes grupos: los virus cutáneos, que infectan y se replican en células epiteliales escamosas de la piel como las verrugas comunes; los virus mucosos lo hacen en mucosas, como conjuntiva, oral, esofágica y genital; este último grupo está generalmente detrás de las transformaciones epiteliales más frecuentes. Los tipos que infectan mucosas presentan una alta especificidad de tejido y un sub-grupo de tipos está asociado con la transmisión sexual dando lugar, en muchos casos, a una lesión pre-cancerosa. En ausencia de tratamiento, este tipo de lesiones puede conducir al desarrollo de cáncer de cuello de útero (cáncer cervical) y otros tipos de cánceres ano-genitales y orofaríngeos^{4,5}.

Recibido: 2-III-2011

Aceptado: 4-V-2011

Dirección postal: Dr. Gonzalo de Prat Gay, Fundación Instituto Leloir, Patricias Argentinas 435, 1405 Buenos Aires, Argentina.
Fax: 0054-11-52387501 e-mail: gpg@leloir.org.ar

Las verrugas genitales causadas por infección con HPV son una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más comunes, tanto en mujeres como en varones. No obstante, a diferencia de la mayoría de las ETS, el virus se aloja exclusivamente en piel y mucosas, no encontrándose ni en sangre ni en otros tejidos u órganos. Este hecho es significativo, en parte para entender la capacidad del HPV de evadir el sistema inmune del huésped, y para su consideración a la hora de planificar el desarrollo de vacunas que necesariamente deben llegar a estas mucosas para otorgar protección efectiva.

Los viriones de HPV fueron encontrados inicialmente en verrugas cutáneas y posteriormente en anogenitales, y existe una variedad de enfermedades a las que los mismos pueden asociarse. Las enfermedades más frecuentes son la neoplasia intraepitelial y el carcinoma de células escamosas, siendo las de mayor relevancia en la población aquellas asociadas a las mucosas genitales⁶. Entre las enfermedades menos frecuentes se encuentra la epidermodisplasia verruciforme, que da lugar a diversas lesiones de la epidermis que pueden culminar en cáncer de piel. También se ha encontrado HPV en un alto porcentaje de las biopsias analizadas en psoriasis⁷.

Cáncer de cuello de útero o cáncer cervical

El cáncer cervical (CC) es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo, luego del cáncer de mama. El CC constituye el 25% de los cánceres femeninos, y el porcentaje de infecciones por HPV de alto riesgo que llegan a cáncer se cuadruplica en países subdesarrollados, mientras que para el cáncer de mama la incidencia es independiente del estado de desarrollo del país. En el nuestro, la incidencia de nuevos casos es de 32.5/100 000 mujeres, estimándose entre 6 000 y 8 000 casos nuevos cada año. Cabe destacar que la incidencia en los EE.UU. es de 10/100 000 y en España de 5/100 000 mujeres.

La observación de la estrecha relación entre HPV y CC tiene como pionero al virologo alemán Harald zur Hausen, quien fue galardonado con el premio Nobel en 2008. Notablemente, dicha correlación es aún más evidente que la observada entre el cigarrillo y el cáncer de pulmón⁶. Existen aproximadamente 30 tipos de HPV asociados al CC, siendo los más frecuentes en países occidentales los tipos -16, -18, -31 y -45, que suman aproximadamente el 80% de los casos⁹. El HPV está implicado en el 99.7% de los CCs de tipo escamoso. Los tipos -6 y -11 causan lesiones benignas como condilomas anogenitales y papilomas en el tracto aerodigestivo superior, conjuntiva y canal auditivo.

Biología molecular del HPV

Los HPV son virus pequeños sin envoltura membranosa y poseen una cápside icosaédrica de aproximadamente

50 nm, la cual alberga el genoma del virus (Fig. 1). Su genoma es de ADN doble cadena circular y consta de aproximadamente 8000 pares de bases, con el potencial de codificar de 8 a 10 productos proteicos¹⁰.

La gran mayoría de los genotipos de HPV presentan una organización génica semejante, con las funciones de control de transcripción y replicación ubicadas en la región de control río arriba (URR), la región de genes tempranos (E) que codifican para proteínas de replicación, control de transcripción y transformación celular, y la región de genes tardíos (L) que codifican para las proteínas de la cápside viral.

Las proteínas E6, E7 y E5 han sido identificadas como los oncogenes virales y responsables de la capacidad transformante de los HPV de alto riesgo. La proteína E1 es una helicasa y la única proteína viral con actividad enzimática, E2, es un factor de transcripción y regulador de la replicación viral, y E4 es un factor pleiotrópico que modifica el citoesqueleto celular.

Viriones y partículas “tipo-virus” recombinantes

La cápside icosaédrica del virus de 55 nm de diámetro, alberga al genoma de ADN circular de 8000 pares de bases (Fig. 1). Dicha cápside está formada por 72 subunidades o capsómeros, que consisten en pentámeros de la proteína L1, de 56 kDa de peso molecular¹¹. Cada cápside contiene, además, aproximadamente 12 moléculas de la proteína L2 de 78 kDa¹². Existen uniones disulfuro entre los monómeros de L1 que estabilizan fuertemente la cápside.

En el epitelio infectado, las proteínas capsídicas, L1 y L2, son sintetizadas en el citoplasma de las células del estrato granular y deben ser translocadas al núcleo por sistemas de transporte diferentes, donde L1 lo hace como pentámero (capsómero). Si bien no se conocen los detalles del ensamblado final del virión, se sabe que L2 participa de la incorporación del genoma del virus a la partícula, el cual requeriría, además, estar unido a la proteína E2. Todo el proceso se lleva a cabo en el núcleo de la célula.

A principios de los años 90, diversos grupos describieron la capacidad de las proteínas L1 y L2 recombinantes de formar partículas “tipo-virus” (VLPs, *virus-like particles*), carentes del genoma viral, y por lo tanto no infectivas. Pronto se estableció que sólo L1 bastaba para formar partículas altamente inmunogénicas¹³. L2 es prescindible para el ensamblado de VLPs pero sería esencial para el empaquetamiento del genoma de ADN dentro de la partícula en la célula.

El hecho que estas VLPs puedan ser producidas en grandes cantidades y con alta pureza, además de poder ser modificadas genéticamente, las convirtió en

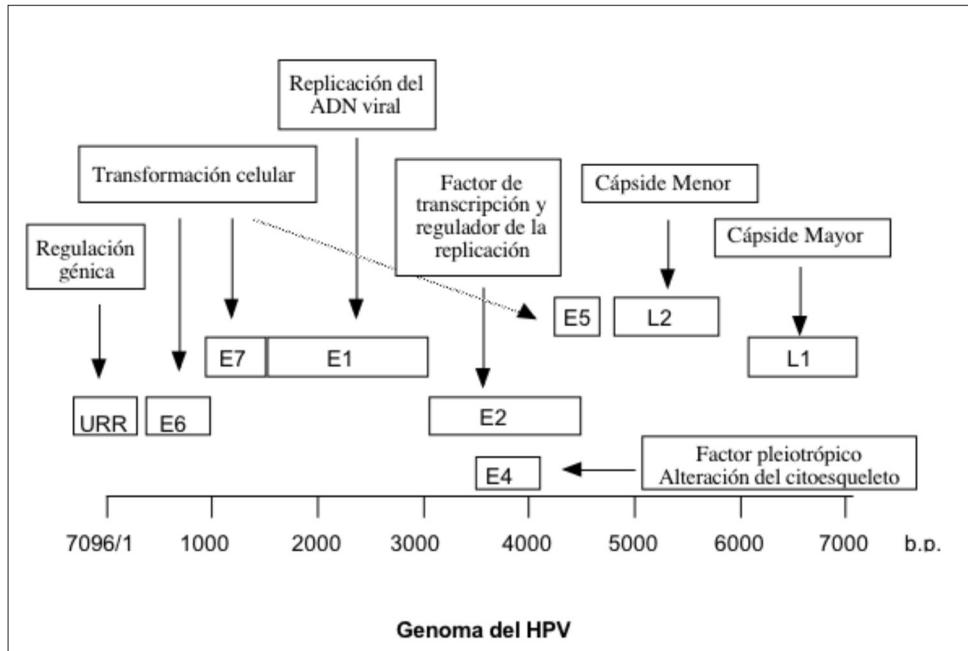


Fig. 1.– Esquema de la organización genómica y de las actividades bioquímicas de las proteínas de HPV.

una herramienta de vital importancia para comprender aspectos estructurales del virus, algo que hasta hoy no es posible con viriones puros. Por otra parte, esta similitud con los viriones, sumada a su alta inmunogenicidad y a su carencia de envoltura membranosa, transformaron a estas partículas en candidatos firmes para la generación de protección inmunológica.

Vacunas aprobadas y desarrollo de vacunas de segunda generación

En 1933, Shope¹⁴ consiguió proteger conejos contra la infección por el virus de ese animal (CRPV), utilizando una vacuna basada en tejido infectado. Un hecho similar fue registrado décadas más tarde con el virus bovino (BPV). No obstante, el traslado de éstas y otras experiencias en animales a humanos es completamente inviable, principalmente por dos motivos. En primer lugar, el virus HPV no puede ser propagado fácilmente en cultivo impidiendo una posible producción a escala. En segundo lugar, aunque el problema de la producción se resolviera, el potencial oncogénico asociado a estos virus impide la utilización de una vacuna con margen de seguridad. Claramente, la respuesta llegaría de la mano del uso de proteínas recombinantes con capacidad de generar respuesta neutralizante, y el candidato natural sería la principal proteína capsídica, L1.

En la actualidad han sido aprobadas dos vacunas, basadas en la expresión recombinante de L1, las cuales han demostrado alta eficacia en la prevención de la infección

de las principales cepas oncogénicas de HPV (Fig. 2)¹⁵. Una de estas vacunas ha sido desarrollada por el laboratorio farmacéutico Merck, se denomina Gardasil® y está compuesta por VLPs de las cepas 16, 18, 6 y 11 que son producidas en forma recombinante en levaduras. La otra vacuna ha sido desarrollada por el laboratorio farmacéutico GlaxoSmithKline bajo el nombre de Cervarix® y está compuesta sólo por VLPs de las cepas 16 y 18 producidas en forma recombinante en células de insectos. Mientras que las cepas 6 y 11 son consideradas de bajo riesgo y están asociadas mayormente al desarrollo de papilomas benignos, las cepas 16 y 18 pertenecen al grupo de cepas de papilomavirus de alto riesgo y son responsables por más del 80% de los CC. Se considera que estas vacunas son específicas de cepa y demuestran poca reactividad cruzada contra cepas de HPV distintas a las cepas de las cuales derivan las VLPs que componen la formulación¹⁶. Ambas vacunas requieren de la aplicación de tres dosis intramusculares para lograr el título de anticuerpos necesarios para asegurar la inmunidad del individuo.

Aunque los ensayos clínicos han demostrado que la administración adecuada de estas vacunas muestra una eficacia de protección frente a la infección de HPV superior al 99%, la inclusión de estas vacunas dentro de los planes de vacunación gubernamentales en países en vía de desarrollo, impactará sensiblemente en el presupuesto de salud, debido a su alto costo por dosis. Recientemente, se ha anunciado que la Argentina incorporará la vacuna profiláctica contra HPV dentro de su calendario nacional de vacunación. El alto costo por dosis de ambas vacunas se debe al elevado costo de producción de las VLPs en

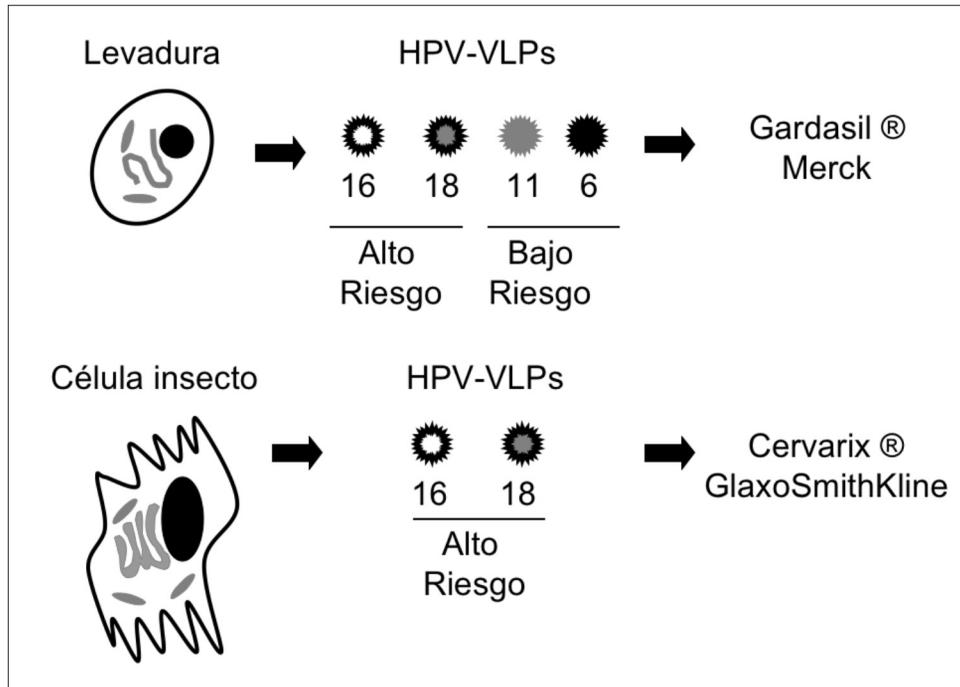


Fig. 2.– Esquema representativo de los sistemas de expresión recombinante de las vacunas profilácticas comerciales. En el panel superior se esquematiza el sistema de producción en levaduras de las VLPs de las cuatro cepas de HPV que componen la vacuna Gardasil®. En el panel inferior se muestra el sistema de expresión recombinante en células de insectos de las VLPs de las dos cepas de HPV que componen la vacuna Cervarix®.

sistemas de expresión recombinante en eucariotas, los cuales requieren procedimientos de alta complejidad y brindan magros rendimientos en el proceso general.

En este contexto es de vital importancia desarrollar una vacuna alternativa de segunda generación, efectiva y de bajo costo, que pueda ser incluida dentro de los planes generales de vacunación en países de nuestra región. Con este objetivo hemos desarrollado un protocolo de obtención de VLPs a partir de la expresión recombinante de la proteína L1 en bacterias. Mediante la utilización de procesos químicos y enzimáticos, la proteína L1 producida se ensambla en VLPs que han demostrado ser altamente inmunogénicas. Mediante esta tecnología se pueden obtener VLPs de distintas cepas de HPV tanto de alto como de bajo riesgo, lo cual permitiría la generación de una vacuna protectora contra múltiples cepas de papilomavirus. Es importante destacar que una vacuna de segunda generación debería ser polivalente e incluir otras cepas de HPV, además de la 16 y 18, ya que un 20% de los CC son causados por otras cepas de alto riesgo⁶.

El mecanismo de ensamblado de una VLP es extremadamente complejo, considerando que es una supraestructura proteica que está compuesta por unos 2.8 millones de átomos que deben ordenarse correctamente en el espacio para adoptar una estructura definida. Sólo basta compararla, como ejemplo, con los 21 átomos de la aspirina, para comprender la magnitud del problema

desde el punto de vista atómico-molecular. El desarrollo involucró el trabajo multidisciplinario en áreas como biología molecular, necesaria para el clonado de proteínas L1 de distintas cepas, química de proteínas para estudiar la calidad de las VLPs producidas y estudios inmunológicos indispensables en la evaluación antigénica de las formulaciones.

Las VLPs obtenidas mediante este novedoso procedimiento han demostrado ser morfológicamente e inmunogénicamente idénticas a las VLPs que componen las vacunas comerciales pero con un costo de producción estimado que permitiría obtener vacunas a precios sensiblemente menores a los actuales (Fig. 3). Asimismo, las VLPs producidas en bacterias han demostrado ser comparables en cuanto a pureza, estabilidad y características fisicoquímicas, con las VLPs producidas en células eucariotas.

En conclusión, el cáncer de cuello de útero es una de las principales causas de mortalidad en mujeres, cuya incidencia podría ser disminuida significativamente previniendo la infección por HPV. Las consecuencias sanitarias que causa la infección por HPV en países en vías de desarrollo son superiores a las que causa la misma enfermedad en países desarrollados, debido a la limitada accesibilidad a los métodos de prevención temprana (Papanicolaou) en los primeros países, y particularmente en aquellos sectores de la población con menores recursos.

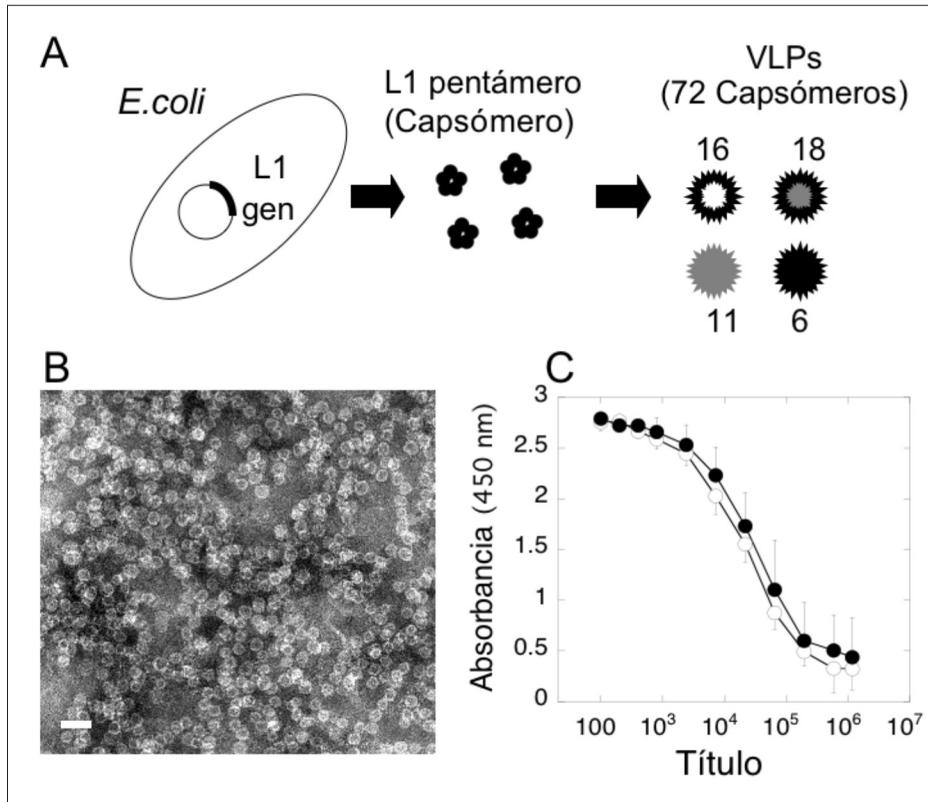


Fig. 3.— Vacunas de segunda generación contra HPV de XBio. Panel A, esquema representativo del sistema de expresión recombinante en bacterias de la vacuna profiláctica de segunda generación. Panel B, microscopía electrónica de las VLPs obtenidas recombinantemente en *Escherichia coli* que componen la vacuna de segunda generación en desarrollo en XBio. Se observan partículas esféricas regulares, de 50 nm de diámetro idénticas a las VLPs de HPV obtenidas de otras fuentes. La barra indica 100 nm. Panel C, titulación por la técnica de ELISA de sueros de ratones inmunizados con vacuna comercial (circulo vacío) o vacuna de segunda generación contra HPV 16 obtenida en bacterias (circulo lleno). La placa fue sensibilizada con VLPs de HPV16 y el ensayo se reveló utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

Estudios realizados en la Argentina sugieren que algunas poblaciones, por ejemplo mujeres quechuas jujeñas, se ven particularmente afectadas y muestran incidencia de cáncer cervical superior a la media informada¹⁷. La existencia de vacunas recombinantes aprobadas para su uso en humanos que han demostrado tanto eficacia como seguridad constituye un hito importante en el combate de esta enfermedad; sin embargo, los elevados costos de estas vacunas limitan su aplicación generalizada y con ello el impacto real que producen en la sociedad.

El correcto ensamblado de una cápside viral es un proceso complejo, que involucra el ordenamiento espacial de varios millones de átomos, la optimización de las condiciones de entorno que establezcan la estructura, la optimización de los métodos de purificación y la plataforma analítica que permita evaluar la pureza del antígeno obtenido. Finalmente se requiere evaluar las propiedades inmunogénicas de la vacuna y compararlas con las vacunas comerciales.

Por último, una vacuna de segunda generación debería ser, a) de bajo costo para poder ser aplicada masivamente;

b) polivalente, para prevenir contra la mayoría de las cepas oncogénicas de HPV y; c) aplicarse en una única dosis con el objetivo de facilitar el proceso y la logística. Estamos confiados que avanzamos sostenidamente en esa dirección.

En la actualidad, la vacuna de segunda generación se encuentra en fase de desarrollo experimental, proyectándose su ingreso a fase preclínica para fines del corriente año.

Bibliografía

1. Tommasino M. Papillomaviruses in human cancer: the role of E6 and E7 onco-proteins. Austin, Texas: Landes Bioscience, 1997.
2. Strauss MJ, Shaw EW, Banfield WG. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 72: 46-50.
3. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 4th (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p 2197-31.

4. González JV, Gutiérrez RA, Keszler A, et al. Virus papiloma humano en lesiones orales. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; 67: 363-8.
5. Picconi MA, Alonio LV, García Carrancá A, et al. Variantes moleculares de virus papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cérvix. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 889-94.
6. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3) S11-25.
7. Cronin JG, Mesher D, Purdie K, et al. Beta-papillomaviruses and psoriasis: an intra-patient comparison of human papillomavirus carriage in skin and hair. *Br J Dermatol* 2008; 159: 113-9.
8. zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-78.
9. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3) S26-34.
10. Howley PM., Fields Virology. Philadelphia: Raven Publishers. 3rd ed. 1996; 2045-76.
11. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 1991; 60: 1445-56.
12. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993; 67: 6929-36.
13. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 12180-4.
14. Shope RE, Hurst EW. Infectious Papillomatosis of rabbits: with a Note on the Histopathology. *J Exp Med* 1933; 58: 607-24.
15. Cohen J. Public health. High hopes and dilemmas for a cervical cancer vaccine. *Science* 2005; 308: 618-21.
16. Schiller JT, Lowy DR. Immunogenicity testing in human papillomavirus virus-like-particle vaccine trials. *J Infect Dis* 2009; 200: 166-71.
17. Picconi MA, Gronda J, Alonio LV, et al. Virus papiloma humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino. Tipos virales y variantes de hpv16. *Medicina (Buenos Aires)* 2002; 62: 209-20.

Western civilization, it seems to me, stands by two great heritages. One is the scientific spirit of adventure – the adventure into the unknown, an unknown that must be recognized as unknown in order to be explored, the demand that the unanswerable mysteries of the universe remain unanswered, the attitude that all is uncertain. To summarize it: humility of the intellect. The other great heritage is Christian ethics – the basis of action on love, the brotherhood of all men, the value of the individual, the humility of the spirit. These two heritages are logically, thoroughly consistent.

La civilización occidental, a mi parecer, se basa en dos grandes herencias. Una es el espíritu científico de aventura – la aventura hacia lo desconocido, un desconocido que debe ser reconocido como tal para poder explorarlo, la exigencia que los misterios del universo se mantengan como tal, la actitud de que todo es incierto. Para resumirlo: la humildad del intelectual. La otra gran herencia es la ética cristiana – con el amor como base de acción, la hermandad de todos los hombres, el valor del individuo, la humildad del espíritu. Estas dos herencias son lógicamente enteramente consistentes.

Richard P. Feynman (1918-1988)

The meaning of it all. Thoughts of a citizen-scientist. Reading MA: Perseus Books, 1998, p 47