



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ciencias de la Vida**

“DISEÑO DE UNA VACUNA HEXAVALENTE RECOMBINANTE  
PARA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPOS 16,18,31,33,  
35 Y 58”

### **INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO**

LADY MAILYN MORALES BARÉN

PAMELA ELIZABETH RODRÍGUEZ CAICEDO

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2017

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios en primer lugar, quien nos da la fortaleza diaria para seguir el camino en el cumplimiento de nuestros sueños y metas. A nuestros padres y familiares quienes con su apoyo incondicional nos han acompañado durante esta importante etapa de nuestras vidas, siendo ellos nuestro ejemplo de superación y maestros de vida.

Agradecemos a nuestro tutor y profesor César Bedoya M.Sc, quién nos ha guiado en la elaboración de este proyecto integrador, despejando nuestras dudas y compartiendo sus conocimientos sobre el tema.

A lo largo de nuestra vida universitaria hemos encontrado personas que nos han apoyado incondicionalmente, amigos, profesores o demás personas que continuarán siendo parte de nuestra vida ahora como profesionales, a todos ellos y sin dejar a nadie en el olvido, muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mi madre, Elizabeth Caicedo.

Pamela.

A mi padre, José Manuel Mesías Morales.

Lady.

## EVALUADOR DEL PROYECTO

---

Ac. César Bedoya Piloza M.Sc

## DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde exclusivamente; y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

---

Lady Mailyn Morales Baren

---

Pamela Elizabeth Rodríguez Caicedo

## RESUMEN

El VPH es un virus de ADN de doble cadena, consta de ocho proteínas constitutivas estructuradas en dos regiones, una región genómica temprana y una tardía. Ambas necesarias para su propagación viral dentro de las células epiteliales escamosas y de la piel.

Los tipos de virus han sido objetivo de este proyecto integrador, existen alrededor de 200 tipos de ellos, y se clasifican según la importancia de su infección, como aquellos que producen pequeñas verrugas en la piel, hasta los tipos que ocasionan el cáncer de cuello uterino, de gran importancia clínica, y en Ecuador, es la primera causa de muerte oncológica en mujeres. Los estudios epidemiológicos demuestran que existe alta frecuencia de mujeres que han tenido infecciones por este virus.

En la actualidad, existen varios tipos de vacunas contra el VPH, entre ellas sobresalen las vacunas profilácticas o preventivas, de estas, solo cuatro han sido aprobadas por la FDA. La vacuna monovalente dirigida a prevenir la infección contra el VPH de tipo 16, la bivalente para el tipo 16 y 18, la tetravalente, para los tipos 6, 11, 16 y 18, y una nonavalente, dirigida a combatir los tipos 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, todas ellas distribuidas en países como Estados Unidos y de Europa.

El fundamento de este proyecto es el diseño de una vacuna hexavalente para los tipos 16, 18, 31, 33, 35 y 58, utilizando la proteína L1 de la cápside del virus para la obtención de partículas no virales o VLPs, por medio de un vector recombinante de VHS-1, que fue tomado a partir de la metodología de Hajmohammdi y Rassi. Este vector fue seleccionado debido a sus características de transferencia génica, además de la eficacia infecciosa del VHS-1 para un gran número de tipos de células, lo que resulta en una transducción génica eficiente.

La obtención de las VLPs del gen de la cápside es eficiente para producir anticuerpos sin necesidad del ADN viral. Su obtención, en este diseño, difiere de los demás, debido a que surge a partir de células eucariotas, como las *Vero* (células de riñón verde africano), y no de procariontes como levaduras o bacterias, como las ya actualmente comercializadas.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA .....	iii
EVALUADOR DEL PROYECTO.....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA.....	v
RESUMEN .....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ABREVIATURA.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	4
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	4
<b>1.1. Breve Historia del VPH.</b> .....	4
<b>1.2. Nomenclatura y clasificación del VPH</b> .....	5
<b>1.3. Epidemiología del VPH</b> .....	8
<b>1.4. Biología del Virus</b> .....	10
<b>1.4.1. Descripción genómica del virus</b> .....	10
<b>1.4.2. Ciclo de vida del virus</b> .....	13
<b>1.5. Vacunación</b> .....	15
<b>1.5.1. Vacunas Profilácticas</b> .....	17
<b>1.5.2. Vacunas Terapéuticas de VPH</b> .....	21
CAPÍTULO 2.....	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
<b>2.1 Obtención de las muestras</b> .....	25
<b>2.2 Obtención del gen L1 de los diferentes tipos de VPH</b> .....	25
<b>2.3 Construcción del recombinante VHS-1/VPHL1</b> .....	27
<b>2.4 Transfección Celular</b> .....	28
<b>2.5 Purificación de las VLPs</b> .....	28
CAPÍTULO 3.....	31

3. RESULTADOS ESPERADOS .....	31
<b>3.1.1. Diseño de una cassette de expresión</b> .....	31
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	34
Conclusiones .....	34
Recomendaciones .....	35
BIBLIOGRAFÍA .....	36

## ABREVIATURA

**VPH:** Virus del papiloma.

**pb:** Pares de bases

**kb:** Kilobases

**VLP:** Partículas virales similares a virus.

**FDA:** Agencia reguladora de medicamentos y alimentos.

**BR:** Bajo riesgo

**AR:** Alto riesgo

**AGWs:** Verrugas anogenitales externas

**EV:** Epidermodisplasia verruciforme

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ORF:** Marco Abierto de Lectura

**NIC:** Neoplasia Intraepitelial Cervical

**P53:** Proteína Supresora de Tumores

**RB:** Retinoblastoma

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNm:** Ácido Ribonucleico de tipo mensajero

**ASO4:** Sistema Adjuvante 04

**TLR:** Receptores de tipo Toll

**TSA:** Antígenos específicos de tumores

**HLA:** Antígeno Leucocitario Humano

**CTL:** Linfocitos T

**CRPV:** Virus del Papiloma de rabo de conejo

**BPV:** Virus del Papiloma Bovino

**COPV:** Virus del Papiloma oral de canes

**ICC:** Cáncer cervical invasivo

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**ICP:** Proteína reguladora de la transcripción

**CD4:** (Cúmulo de diferenciación 4) Células del Sistema Inmunitario

**LSILs:** Lesiones escamosas intrapiteliales

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1. Variedad de tipos de VPH.....	6
Figura 1.2 Incidencia estimada del cáncer cervical en el mundo para el año 2012.....	9
Figura 1.3. Diagrama esquemático de la cápside del papiloma (o polioma).	11
Figura 1.4. Organización genómica del VPH. ....	13
Figura 1.5. Ciclo de vida del virus del VPH. [1].....	14
Figura 1.6 Estadios de evolución del cáncer de cuello uterino. ....	16
Figura 2.1 Diseño de la metodología para la elaboración de la vacuna hexavalente.....	24
Figura 2.2: Esquema de la purificación de VLPs. ....	29
Figura 3.1 Cassette de expresión VHS-1/VHP .....	31
Figura 3.2: Diseño del vector recombinante viral incluyendo el sitio de inserción del gen L1. ....	33
Tabla 1. Clasificación de los VPH de acuerdo con su forma infecciosa.....	7
Tabla 2. Composición de las vacunas contra el VPH. ....	20

## INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de ADN circular de doble filamento, no envuelto, de la familia *Papillomaviridae* [1]. El virus entra en el epitelio a través de la ruptura de la piel o la mucosa e infecta las células madre basales [2]. Su genoma contiene siete genes de fase temprana (E) y dos tardíos (L) necesarios para la propagación viral [1].

El VPH es uno de los cuatro virus de ADN conocidos que contribuyen al desarrollo de cáncer en humanos [3], causan papilomas en el epitelio, y existen más de 205 genotipos diferentes identificados hasta la fecha [4]. Los genotipos del VPH se dividen en categorías de bajo riesgo (BR) y alto riesgo (AR) basadas en el espectro de lesiones que inducen. Quince tipos de VPH se clasifican como tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82); se clasifican como tipos probables de alto riesgo (26, 53 y 66) y 12 se clasifican como tipos de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) [1].

E6 y E7 son oncoproteínas, es decir, proteínas que causan desregulación del ciclo celular y transformación de tejidos en neoplasia, que inactivan las proteínas p53 y pRb respectivamente. Los VPH oncogénicos causan casi 100% de cánceres cervicales, 90% de anal, 70% de vagina, 40% de vulva, 50% de pene y 13% a 72% de cánceres orofaríngeos y VPH 16 predomina en todos estos VPH no cervicales relacionados. VPH 6 y VPH 11, que se clasifican como genotipos de bajo riesgo, causan el 90% de las verrugas genitales, así como la rara pero debilitante papilomatosis respiratoria recurrente (RRP) [5].

En Estados Unidos, afecta aproximadamente a 4,6 millones de individuos entre edades de 15 y 24 años [6]. Un estimado de 30 millones de individuos sexualmente activos poseen verrugas anogenitales externas (AGWs) cada año, cuyo riesgo es del 10%. Alrededor de un millón de personas que se realizan papanicolaou (Pap) reportan lesiones escamosas intraepiteliales cervicales de bajo riesgo (LSILs) en Estados Unidos, el 15% son causados por VPH6 u 11 [6]. Cada año, aproximadamente 500.000 mujeres desarrollan cáncer de cuello uterino en el mundo, haciendo de esta enfermedad la segunda causa de muerte más común en mujeres [7].

En Ecuador pocos estudios se han enfocado en la epidemiología del VPH, debido a que existe una subvaloración del VPH en la población ecuatoriana. El cáncer de cuello uterino en Ecuador es la primera causa de muerte oncológica en mujeres [8]. Sin embargo en el 2004, un estudio piloto que planteó investigar la incidencia de este virus en mujeres (71 casos), encontró una prevalencia del 43.7% de mujeres con VPH [9]

Los estudios epidemiológicos demuestran que existe una alta frecuencia de mujeres que han tenido infecciones por virus del papiloma. Se puede decir que de 10 mujeres, 8 tienen o tuvieron en una etapa de su vida una infección provocada por VPH [10].

La exploración de rutina es fundamental para la detección temprana del VPH, la prevención de enfermedades asociadas y el cáncer. El frotis Papanicolaou, o la prueba de Papanicolaou, ha sido el método de elección para el cribado del cáncer cervical por más de 60 años [11].

Aunque la mayoría de los individuos permanecen asintomáticos y espontáneamente limpian sus infecciones, un pequeño porcentaje de pacientes desarrollan lesiones clínica o histológicamente reconocibles que se convierten en cáncer invasivo. El uso generalizado de cribado citológico cervical mediante pruebas de Papanicolaou ha reducido la tasa de mortalidad por cáncer de cuello uterino en los países desarrollados [12].

Sin embargo, en los países en desarrollo donde los programas de detección son mínimos, el cáncer de cuello uterino sigue siendo la segunda causa principal de muertes relacionadas con el cáncer entre las mujeres. Además, las pruebas de Papanicolaou no ayudarán a identificar la infección por VPH en varones, así como los cánceres de la cabeza y el cuello. Por lo tanto, es esencial desarrollar estrategias profilácticas y terapéuticas eficaces dirigidas contra el VPH.

Tradicionalmente, las vacunas profilácticas que generan anticuerpos neutralizantes específicos del virus han representado un medio rentable para controlar las enfermedades virales. En teoría, el VPH no debería ser una excepción, pero el exquisito tropismo de tejido y la biología compleja de los papilomavirus los diferencian de la mayoría de los otros virus contra los cuales la vacunación ha demostrado ser exitosa [13].

En junio de 2006, Gardasil, una vacuna de VPH basada en VLP desarrollado por Merck, fue aprobado por la FDA como una vacuna contra los tipos 6, 11, 16 y 18 del VPH y otro VPH 16/18, la vacuna VLP, Cervarix, desarrollada por GlaxoSmithKline, cuya aprobación de la FDA se realizó en 2007 [14]. Como Gardasil es la primera vacuna aprobada contra los tipos 16 y 18 del VPH, más comúnmente encontrados en el cáncer de cuello uterino, la atención durante el último año se ha centrado en el desarrollo y aplicación de tales vacunas VLP de HPV.

Ambas vacunas han sido evaluadas en ensayos clínicos aleatorizados, controlados con placebo. En las mujeres que no tienen evidencia de exposición o infección a los genotipos del VPH en la vacuna, ambas vacunas muestran una alta eficacia, con más del 90% de reducción en la infección persistente y una reducción del 100% en las lesiones cervicales de alto grado [15].

Con respecto a lo planteado, y la problemática existente, hemos decidido presentar en este proyecto una solución cuyo objetivo principal es el diseño de una vacuna recombinante con partículas virales (VLPs) para el VPH de los tipos 16, 18, 31, 33, 35 y 58. La misma que se desarrollará persiguiendo los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar las proteínas y los genes que la codifican que será utilizada para el diseño de la vacuna.
- Diseñar un constructo genético para la obtención de las VLPs
- Diseñar una metodología para el rescate de las VLPs a partir de líneas celulares eucariotas/procariotas.

## CAPÍTULO 1

### 1. INFORMACIÓN GENERAL

#### 1.1. Breve Historia del VPH.

El estudio del Virus del Papiloma Humano consiguió sus alcances a finales del siglo XIX a partir del conocimiento sobre el potencial de transmisión que tenían las verrugas genitales y no genitales; y el estudio a nivel molecular de las mismas, relacionó estas anomalías con el VPH y posteriormente el descubrimiento de la existencia de varios tipos genéticos del virus [3]. Se reconocieron en ese entonces que existían más de un tipo de virus de VPH que causaba verrugas cutáneas, y que otros estaban relacionadas a lesiones en la piel como la epidermodisplasia verruciforme (EV)[16].

Los estudios sobre los virus hallados en lesiones de pacientes con EV a diferentes etapas, dieron lugar a la caracterización de cada vez más tipos de VPH, lo que llegó a determinar que algunos VPH presentaban un mayor potencial oncogénico que otros [17], esto debido a que muchas de las lesiones cutáneas provocadas por EV progresaban en carcinoma de células escamosas en diferentes pacientes, demostrando así que el VPH estaba implicado a la presencia de carcinomas y progresivamente en cáncer [3].

Posteriormente, a mediados de 1970 comienzan los estudios de la mucosa genital por parte de Zur Hausen y sus colegas. Estudios previos como el de Meisels y Fortin en 1976, demostraron que las anomalías celulares de la displasia cervical eran similares a las provocadas por papilomas virales, dando indicios de que el VPH también intervenía en anomalías relacionadas al cuello uterino [18]. A finales de esta década, se contaba ya con la tecnología de ADN, la misma que se utilizó para aislar el genoma de los VPH identificados de dichas anomalías. Mediante ensayos de hibridación y restricción demostraron que los virus que aislaron de las diferentes muestras clínicas no eran todos idénticos, así que se procedió a clasificarlos por tipos en 1, 2, 3, 4 y así de forma sucesiva, según se iban descubriendo nuevos subtipos del virus [19].

Para 1983, Mathias Durst juntos con sus colaboradores y Zur Hausen aíslan una muestra de biopsia de cáncer invasivo de cuello uterino, que contenía secuencias que

se hibridaban con ADN del tipo 11 de VPH sólo en condiciones no tensas. Este nuevo tipo de VPH lo denominaron VPH tipo 16 [20] y luego junto a Michael Boshart, identifican el VPH tipo 18 en 1984 [21]. Estudios posteriores indicaron que únicamente la infección con cualquiera de los dos tipos no provocaba el cáncer de cuello uterino, sino que iniciaban partir de tipos de alto riesgo [22], y la forma en la que los genes se integraban en el huésped [3].

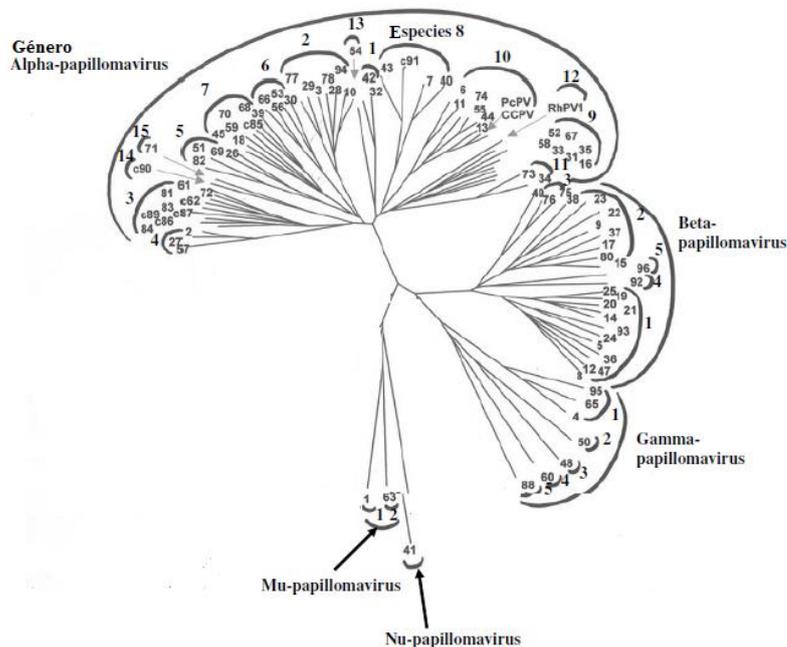
Ambos resultados permitieron a los investigadores ahondar sobre la conformación genómica del virus y sus proteínas, determinando así aquellas que se encontraban presentes en los tumores y en las infecciones benignas. Fue así como en 1987 se determina que la progresión de cáncer de cuello uterino en las mujeres, a partir de una infección de VPH de alto riesgo está dada por la acción de las proteínas oncogénicas E6 y E7 que participan inhibiendo receptores celulares disminuyendo la acción del sistema inmune [3].

Para comprobar estos resultados, los investigadores Lambert y Albert, transfieren a ratones transgénicos el ADN del VPH 16 junto con las proteínas E6 y E7, los mismos que luego presentaron papilomas, hiperplasia epitelial y carcinomas [3].

Para los años 90 ya se podía tener una noción más clara sobre el riesgo de infección del VPH, considerándolo, como uno de los principales causantes del cáncer de cuello uterino a nivel mundial [1].

## **1.2. Nomenclatura y clasificación del VPH**

La nomenclatura de los Papillomavirus a nivel de especie y taxonómicamente superior está regulada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, mientras que los niveles inferiores, como los tipos, son regulados por el Centro de Referencia Internacional del VPH [4]. Para la tipificación y respectiva numeración viral se utiliza un sistema basado en la secuencia del ADN del ORF (Open Reading Frame) L1 del virus y se compara su homología con otro tipo relacionado, la misma que debe ser al menos del 10 por ciento. La numeración de un nuevo tipo del VPH es dada sólo luego de haber sido secuenciado su genoma completo y almacenado en el centro de referencia antes citado [4].



**Figura 1.1. Variedad de tipos de VPH.**

Se observa la distribución por género [3].

Hasta el 2016, 205 tipos de VPH han sido identificados y categorizados dentro de los cinco géneros conocidos [4]: alfa-papillomavirus, beta-papillomavirus, gama-papillomavirus, mu-papillomavirus y nu-papillomavirus [4]. Esta clasificación fue hecha por Villiers en el 2004, donde el autor publica una lista completa de todos los tipos de VP y su orden taxonómico, donde reúne a todos los VPH de acuerdo con los grupos que causan una similar infección, como se detalla en la tabla 1. Este es el caso de todos los VPH "genitales" que se encuentran dentro de los alfa-papillomavirus, y los tipos de VP más a menudo asociados con la EV como beta-VPH. El grupo de trabajo y la ICTV tomaron la iniciativa de introducir el alfabeto griego para esta taxonomía a partir de la taxonomía generalmente aceptada de herpesvirus [23].

**Tabla 1. Clasificación de los VPH de acuerdo con su forma infecciosa.**

Cada tipo de VPH está clasificado dentro de una especie que coinciden en los síntomas que presentan, y los tipos que integran la especie [3].

Familia Papillomaviridae			
Género	Especie	Tipo VPH	Tipo de infección
Alpha- papilomavirus	4	2,27,57	Verrugas comunes, aparecen en niños como verrugas genitales
	5	26, 51, 69, 82	Lesiones benignas y malignas de alto riesgo
	6	53, 30, 56, 66	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosa, común en adenocarcinoma
	7	18, 39, 45, 59, 68, 70	Lesiones mucosas y cutáneas de bajo riesgo
	8	7, 40, 43	VPH 16, mayor presencia en cáncer de cuello uterino
	9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	Lesiones benignas de la mucosa, VPH 6 y 11 presentes en verrugas genitales de hombres y mujeres, condiloma acuminata del cérvix, papilomas laríngeos, pueden progresar de forma maligna
	10	6, 11, 13, 44, 74	
Beta- papilomavirus	1	5, 8	Lesiones cutáneas benignas y malignas en EV y pacientes inmunodepresivos
Gamma- papilomavirus	1	4, 65	Lesiones cutáneas benignas
Mu- papilomavirus	1, 2	1, 63	Lesiones cutáneas, frecuentemente presentes en verrugas de pies
Nu- papilomavirus	1	41	Lesiones cutáneas

Los aproximadamente 40 VPH alfa que infectan el epitelio de la mucosa se clasifican como bajo riesgo (LR) o alto riesgo (HR), basados en su asociación clínica con verrugas generalmente benignas o lesiones que tienen una propensión a la progresión maligna [11].

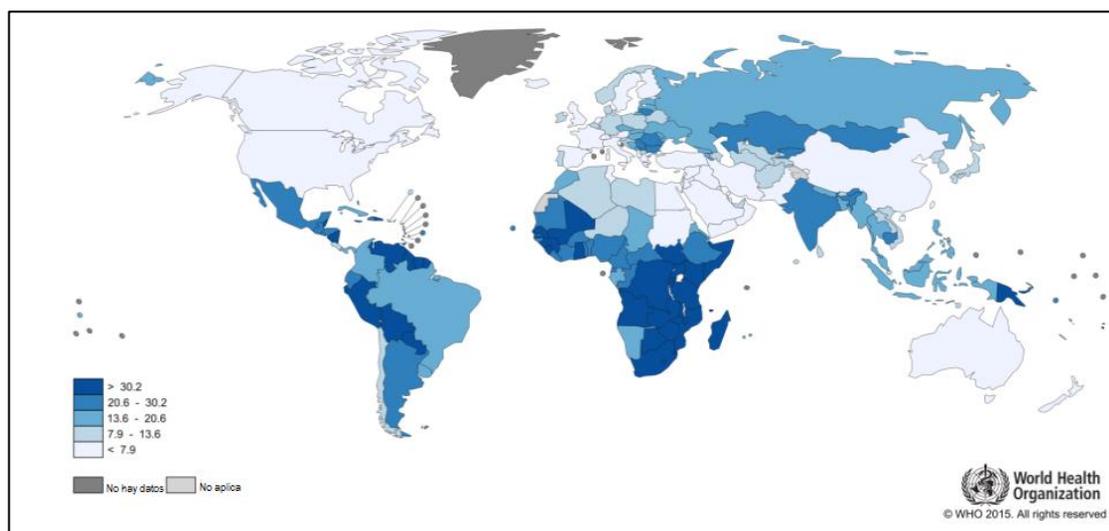
Casi todos los cánceres de cuello uterino son causados por VPH de HR y dos tipos, VPH16 y VPH18, se detectan en hasta el 70% de todos los cánceres cervicales. Las infecciones por VPH también representan el 95% de los cánceres anales, el 70% de los cánceres orofaríngeos, el 60% de los cánceres vaginales, 50% de cánceres vulvares y 35% de cánceres penianos. VPH16 es de lejos el más prevalente tipo de VPH detectado en estos tipos de cáncer [11].

### **1.3. Epidemiología del VPH**

La presencia de VPH 16 y 18 representan el 70% del cáncer cervicouterino en el mundo [24] La mayor prevalencia de HPV de alto riesgo oncogénico son los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59 y se localizan en África y América Latina. VPH 16 es el más frecuente en el mundo, excepto Indonesia y Argelia donde VPH 18 es el más común VPH 45 presenta alta frecuencia en África Occidental. Los tipos 33, 39 y 59 se concentran en Centroamérica y Sudamérica [25]

En países de Europa, como Polonia hay un visible aumento constante en la incidencia de tumores malignos. En 2010, se registraron 140.000 nuevos casos y 92.500 muertes. En Polonia, el cáncer oral es segundo al cáncer de laringe cuando se trata de tumores malignos de la cabeza y el cuello [26].

En el continente americano, de manera precisa en Estados Unidos cerca de 6,2 millones de nuevas infecciones por VPH ocurren cada año, y aproximadamente 20 millones de personas están actualmente infectadas. Los Centros para el Control de Enfermedades calculan que al menos la mitad de todos los individuos sexualmente activos adquirirán VPH en algún momento de sus vidas, mientras que al menos el 80% de las mujeres adquirirán una infección por VPH a los 50 años. En los Estados Unidos, se estima que el 10% de la población tiene una infección activa por VPH, el 4% tiene una infección que ha causado anomalías citológicas y un 1% adicional tiene infección causante de verrugas genitales [27].



**Figura 1.2 Incidencia estimada del cáncer cervical en el mundo para el año 2012.**

**Fuente:** WHO.org

En Ecuador pocos estudios se han enfocado en la epidemiología del VPH, debido a que existe una subvaloración del VPH en de la población ecuatoriana. El cáncer cervicouterino en Ecuador es la primera causa de muerte oncológica en mujeres [8]. Sin embargo en el 2004, un estudio piloto que planteó investigar la incidencia del VPH en mujeres (71 casos), encontró una prevalencia del 43.7% de mujeres con VPH [9]

Los estudios epidemiológicos demuestran que existe una alta frecuencia de mujeres que han tenido infecciones por papilomavirus. Se puede decir que de 10 mujeres, 8 tienen o tuvieron en una etapa de su vida una infección provocada por VPH [10].

Un estudio realizado en la provincia del Azuay, enfocado en un total de 53.102 mujeres que oscilaban entre 17 a 50 años y con una vida sexual activa. Se encontró que el 20.8% de las mujeres, prevalecen los genotipos de VPH con alto riesgo oncogénicos. De los cuales los genotipos 31 y 66 se encuentran con más frecuencia en mujeres de 20 a 29 años y el 4.8% prevalece los genotipos de VPH con bajo riesgo oncogénico [28]

Hay estudios que se han realizado en instituciones de salud como el de SOLCA en el 2009 , muestra que en Cuenca hay una prevalencia de 37.1%, en Santa Elena 24.2%

[29] y en el Hospital Metropolitano de Quito que es de 67.7% [30] Sin embargo, este tipo de estudios se deberían realizar en cada provincia del país para conocer que genotipos son los que más afectan a las mujeres ecuatorianas.

Varios de los problemas asociados a la prevalencia de cáncer cervicouterino en Ecuador, son causados por la poca rutina de realizarse exámenes de detección de este tipo de cáncer y la falta de acceso masivo a estos exámenes, a causa de factores económicos o por logística [29].

#### **1.4. Biología del Virus**

Los VPHs forman parte del grupo de virus de ADN no envueltos. Poseen genomas de ADN de doble cadena con un tamaño aproximado a 8 kb. Pertenece a la familia Papillomaviridae [1]. Se replica mediante la infección de las células epiteliales y dependen de la diferenciación para completar su ciclo de vida [2][3].

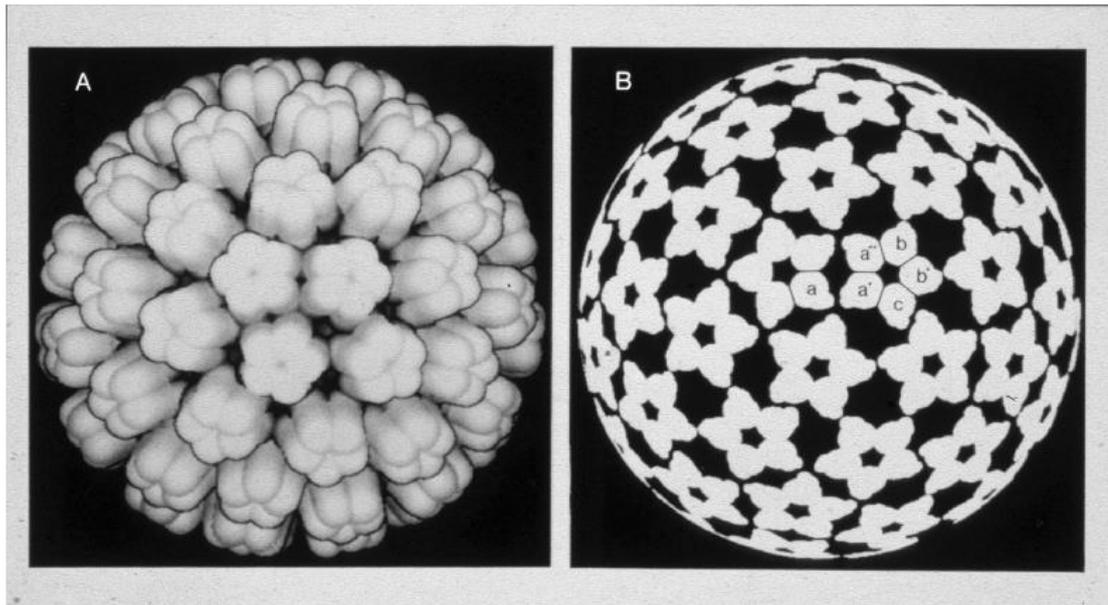
El virus es estable a un pH = 3-7, se inactiva a 70°C y muere después de 30 minutos a una temperatura por encima de 50°C. Es resistente a los solventes, ácidos y radiografía. En general, la infección por virus conduce a la destrucción de la célula. Sin embargo, también puede causar la transformación celular y el desarrollo de tumores [4].

Los diferentes subtipos de VPH varían en la capacidad de infectar sitios epiteliales diferentes [7]. Existe una gran relación entre el VPH y el cáncer de cuello uterino, el pene, la vulva, vagina, ano y la faringe (incluyendo las amígdalas y la parte inferior de la lengua) cavidad oral y laringe [8].

##### **1.4.1. Descripción genómica del virus**

El VPH tiene entre 45-55 nm de diámetro y no posee envoltura. El material genético está en la forma de un ADN de doble cadena, que representa el 10-13% de la masa del virión. El genoma viral consta de 7200-8000 pares de bases [9].

Su cápside está compuesta por 72 pentámeros (capsómeros) de los cuales la principal proteína de la cápside (L1) está dispuesta sobre una celosía icosaédrica T=7. La proteína menor de la cápside interna (L2) está asociada con un subconjunto de los pentámeros L1 que forman la envoltura exterior [1].



**Figura 1.3. Diagrama esquemático de la cápside del papiloma (o polioma).**

72 pentámeros (denominados capsómeros) de la proteína mayor de la cápside L1 se disponen en una red icosaédrica  $T = 7$  [3].

La organización del genoma de todos los tipos de VPH son similares. Poseen un genoma de ADN circular. Tiene regiones de codificación temprana y tardía, así como secuencias que regulan la transcripción y replicación.

### **Región temprana**

También llamada región E, comprende E1, E2, E4-E7 y representa el 50% del genoma.

Los fragmentos tempranos E1 Y E2 están implicados en la regulación de la transcripción y replicación del ADN. Mientras que E5, E6 y E7 se encargan de la transformación celular. Y los fragmentos tardíos codifican proteínas estructurales del virión. Estos fragmentos descritos como ORF (Open Reading Frame) se encuentran en una sola cadena de ADN [3].

Una vez que el ADN viral de alto riesgo ingreso en el genoma del huésped, las células transformadas sobre expresan la proteína E6 y E7, iniciando el proceso de transformación maligna. La expresión de estas proteínas retrasa la diferenciación de los queratinocitos y estimula la progresión del ciclo celular, permitiendo que el virus

utilice ADN polimerasas para replicar su genoma. Los objetivos principales de las proteínas E6 y E7 son el p53 y las proteínas supresoras de tumores de retinoblastoma (Rb), respectivamente, pero también hay objetivos celulares adicionales [3].

Los genes E6 y E7 del VPH se expresan a niveles bajos en la proliferación basal, pero están altamente expresadas en los cánceres genitales asociados al VPH.

Como consecuencia, las proteínas E6 y E7 pueden servir como principales dianas para la respuesta inmune mediada por células y, por lo tanto, para inmunoterapias específicas [3].

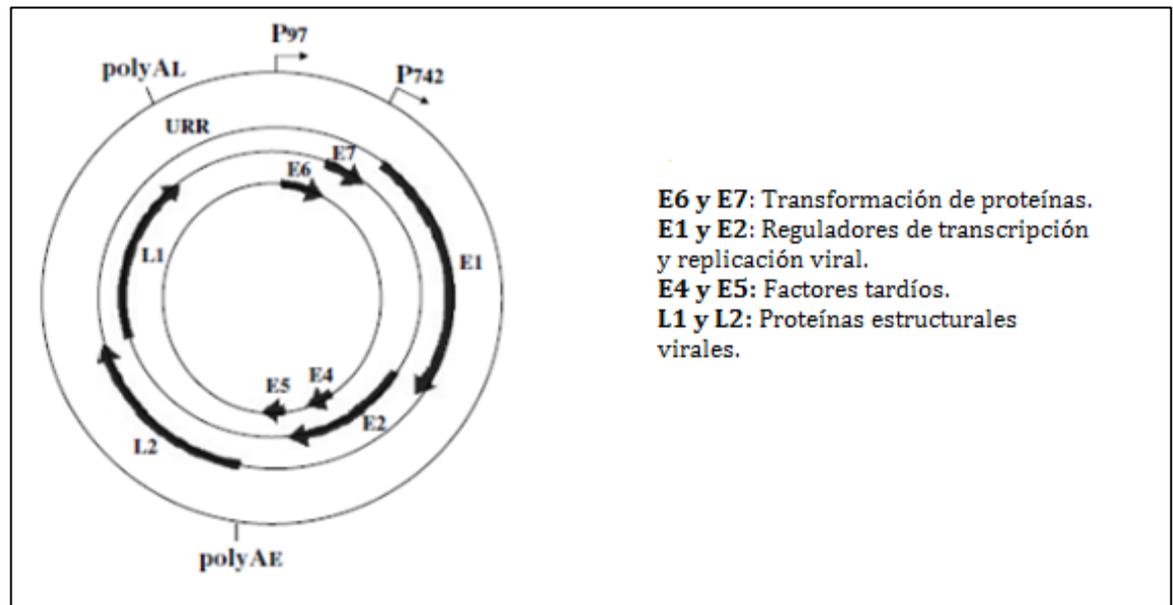
### **Región tardía**

La región tardía L, donde se encuentra L1 y L2, representan el 40% del genoma y constituyen la región reguladora genómica (10% de la región del genoma) [10].

L1 es la proteína mayor de la cápside de papilomavirus, posee la capacidad de autoensamblarse en partículas virales (VLP) que poseen características morfológicas e inmunológicas similares a los viriones originales [11]. Esta proteína permite la unión inicial a las células del huésped [12].

Durante el proceso de ensamblaje del virión las interacciones de L1 deben ser lo suficientemente flexibles para permitir la captación selectiva del ADN genómico viral en el lumen del virión [12].

En la Fig.1 se muestra cada uno de los componentes del genoma del VPH y sus funciones biológicas.



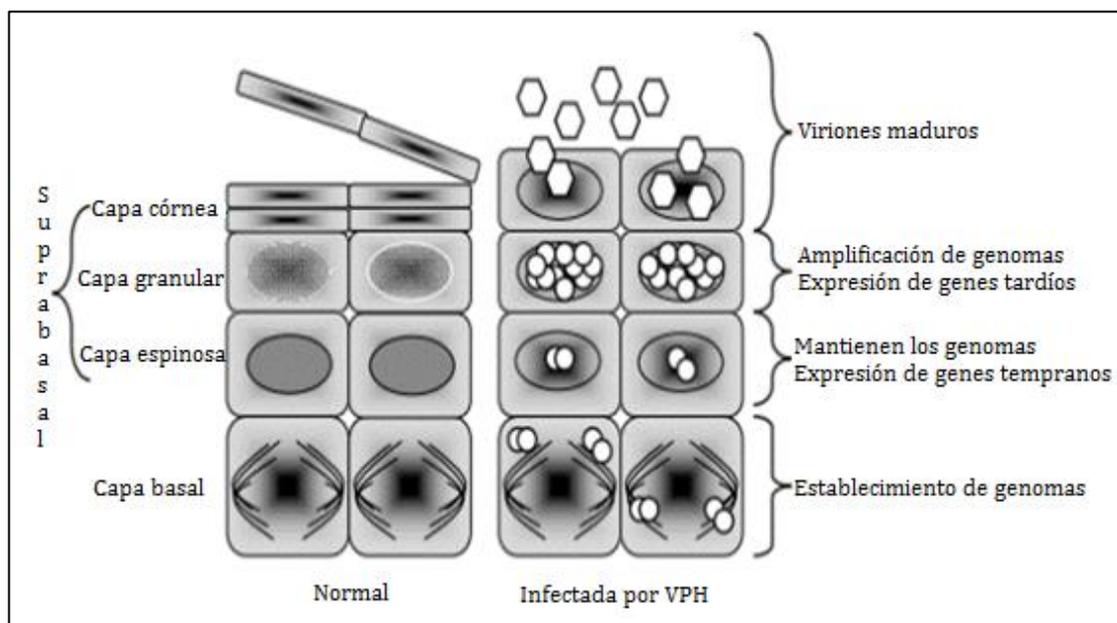
**Figura 1.4. Organización genómica del VPH.**

Se observan los diferentes genes que conforman el genoma completo del VPH con sus respectivas regiones [3].

#### 1.4.2. Ciclo de vida del virus

El ciclo de vida de los VPH se encuentra relacionado al programa de diferenciación del tejido epitelial del huésped. El receptor celular para la entrada del virus es aún desconocido; sin embargo, el sulfato de heparina facilita el ensamblaje del virus en algunos tipos de células.

Mientras el virus se une y entra, los viriones van al núcleo y se establecen sus genomas como multi-copia extracromosomal de plásmido, estos se mantienen aproximadamente de 20 a 100 copias por cada célula basal.



**Figura 1.5. Ciclo de vida del virus del VPH. [1]**

La replicación del genoma viral ocurre en la fase S del ciclo celular a través de la acción de la E1 y E2 en cooperación con proteínas de replicación celular. Después de la replicación del genoma viral y la división celular, una de las células hijas migra fuera de la capa basal e inicia un programa de diferenciación. (Figura 2).

Los queratinocitos normales no infectados, salen del ciclo celular. Después de salir, la capa basal, y los núcleos se degradan en muchas de estas células diferenciadoras.

Por el contrario, las células infectadas con el VPH experimentan diferenciación, pero permanecen activas en el ciclo celular. Esto permite que las células suprabasales vuelvan a entrar en la fase S y produzcan la replicación de ADN viral. La capacidad de las células diferenciadas para sufrir la progresión del ciclo celular, está mediada en gran parte por la acción de la proteína vírica E7. La amplificación dependiente de la diferenciación de los genomas virales en las células suprabasales coincide con la activación tardía del promotor.

Los transcritos víricos tardíos codifican las proteínas de cápside L1 y L2 así como dos mediadores adicionales de las funciones virales tardías, E1, E4 y E5. Los viriones de la progenie se ensamblan en células altamente diferenciadas y se liberan al medio

extracelular [1] aproximadamente. No forma VLP pero puede incorporarse cuando se co-expresa con L1. Cumple un rol fundamental durante el ensamblaje del virión y el proceso infeccioso [13].

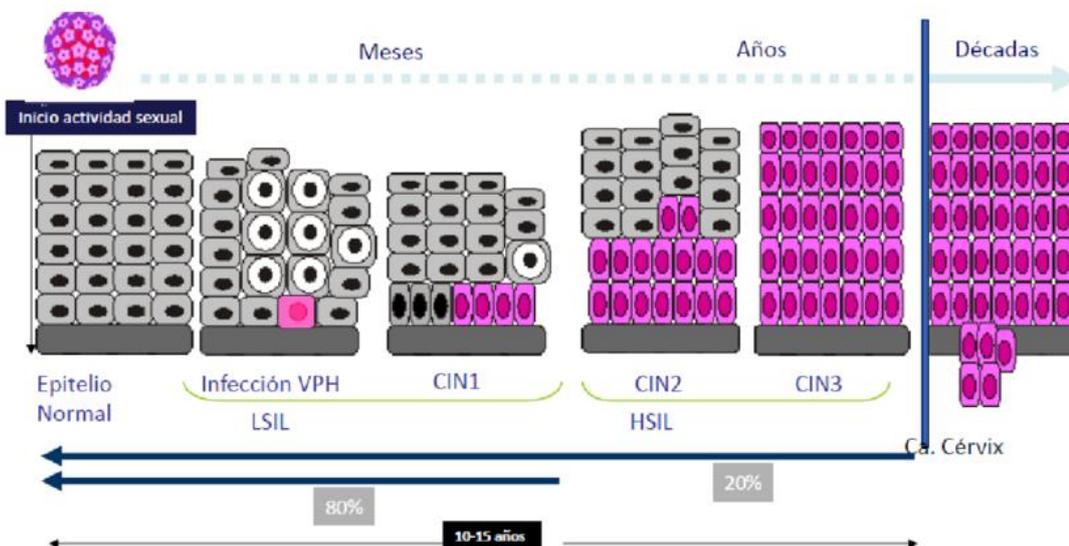
### **1.5. Vacunación**

El VPH es considerado en la actualidad una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes, comenzando desde la aparición de verrugas hasta su progresión en cáncer, no solo de cuello uterino, sino también su relación con demás tipos de cáncer desarrollados en la mucosa [31].

En general, el cáncer de cuello uterino puede ser adquirido por la mujer en cualquier etapa de su vida, pero es aún más común al iniciar su actividad sexual. En la mayoría de los casos puede desaparecer del sistema inmune, y en otros, el genoma viral puede integrarse en el ADN del huésped [32]. Así mismo, estudios sobre este tipo de cáncer determinaron que es uno de los pocos cánceres que puede ser curado si es detectado en sus fases tempranas [31].

La importancia de esta infección se debe a que se detecta en más del 99% de todos los cánceres del cuello uterino, y principalmente el VPH16 es el tipo más comúnmente relacionado con este tipo de cáncer, junto con el VPH18. Ambos tipos se detectan en más del 70% de los cánceres cervicales invasivos y neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (CIN) en todo el mundo y en el 25% de CIN de bajo grado. Los tipos 6 y 11 del VPH causan más del 90% de las verrugas genitales. Los VPH6 y 11 raramente se detectan en la enfermedad anogenital maligna y se consideran como VPH de bajo riesgo no oncogénicos [33].

Debido a la importancia de estas enfermedades en la población mundial, y el reconocimiento de que la neoplasia cervical comienza como un cambio intraepitelial, que suele tardar muchos años en desarrollar una enfermedad invasiva, como se observa en la figura 1.6.



**Figura 1.6 Estadios de evolución del cáncer de cuello uterino.**

**Fuente:** Researchgate.com

Varias estrategias fueron diseñadas para desarrollar vacunas contra estos virus, ya sea para prevención de la infección, desarrollo del cáncer o ayudar al sistema inmune a controlar las infecciones virales [31]. Existen hasta el momento dos tipos de vacunas, profilácticas y terapéuticas; las primeras que previenen infecciones con la producción de anticuerpos que neutralizan partículas virales, usando virus atenuados o muertos, y la segunda, dirigida a impulsar el sistema inmune mediado por células eliminando así infecciones existentes [31].

Varios estudios permitieron mostrar cuales son los requisitos primarios para desarrollar una vacuna contra el VPH. Uno de ellos es establecer una barrera inmunológica en el portal de entrada, es decir, la superficie cervicovaginal, en mujeres, y el epitelio anogenital, en hombres; dirigida a las proteínas que constituyen la envoltura del virus, como la L1 y / o L2 [34], dicha metodología fue aplicada para las vacunas que se fabrican actualmente.

Una vacuna efectiva contra el VPH genital debería ser hábil para prevenir infecciones y reinfecciones mediante la generación de una adecuada respuesta inmune en el sitio y momento de la infección, así como debería ser posible proteger al individuo de futuras infecciones virales [13].

Aunque es muy importante recalcar por qué el diseño de ensayos de vacunas de VPH se complica, primero por la historia natural de la infección, por la abundancia de genotipos distintos, y el largo tiempo de retraso entre la infección y la aparición de la enfermedad [35].

Además del tropismo tan elevado que posee el virus con las células epiteliales y mucosas del ser humano, lo que constituye otra gran limitación en el desarrollo de sistemas que permitan estudiar la relación del huésped con el virus bajo condiciones naturales y en consecuencia la producción de virus atenuados o mediante el uso de estrategias convencionales [13].

El ciclo de vida del VPH es exclusivamente intraepitelial y sólo un epitelio escamoso totalmente diferenciado apoya el ciclo infeccioso completo y la producción de partículas infecciosas [36]. No hay viremia detectable; las partículas de virus se desprenden de las superficies de las mucosas lejos de los vasos linfáticos y vasculares y, como era de esperar, las respuestas inmunitarias sistémicas y humorales a los antígenos del VPH son pobres [37].

Actualmente se desarrolló una estrategia alternativa efectiva que va por encima de las estrategias convencionales. Este sistema propuesto por Zhou y sus colegas hace más de una década propone la expresión de la proteína L1 sola o en combinación con la L2 para la formación de estructuras similares a la partícula viral original, conocida como virus like-particles o partículas iguales a virus (VLPs) [13].

En base a esta alternativa se han desarrollado vacunas preventivas o profilácticas, aprobadas por la FDA y que se comercializan actualmente. Cada una de ellas bajo una metodología de tecnología recombinante, muy similar entre ellas, que varía en el tipo de virus que busca el sistema inmune proteger de acuerdo a su importancia clínica.

### **1.5.1. Vacunas Profilácticas**

Este tipo de vacunas, están basadas en partículas virales del papilomavirus. Estas particulares virales no contienen ADN, no son infecciosas y tampoco oncológicas. El requisito principal que contienen estas vacunas son los VLPs, que son similares a los viriones ya que son de generar anticuerpos que neutralizan el virus. Las VLPs de L1

se pueden generar utilizando varios sistemas de producción, ahora se producen a partir de la transfección de células humanas cultivadas, en levadura o incluso en bacterias. Este tipo de vacunas son preventivas.[1]

Dentro de las vacunas profilácticas, se encuentran algunas que ya son comercializadas para diferentes tipos de VPH. A continuación, se detalla cada una de ellas:

### **Vacuna Monovalente**

La vacuna del tipo VPH 16 de partículas virales de la proteína L1 (Merck Research Laboratories) consiste en partículas de virus muy purificadas de la cápside L1 de VPH-16. El polipéptido L1 de VPH16 se expresa en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Las partículas virales se aíslan con el uso de técnicas estándar para conseguir una pureza de más de 97% y se adsorben sobre adyuvante amorfo de sulfato de hidroxifosfato de aluminio sin conservante. La vacuna VPH16 contiene 40 µg de VLP de L1 de VPH16 formulad sobre 225 µg de coadyuvante de aluminio en un volumen portador total de 0,5 ml. El placebo contiene 225 µg de adyuvante de aluminio en un volumen portador total de 0,5 ml.[38]

La proteína L1 autoensambla a una partícula similar a virus (VLP) y esta es altamente inmunogénica. La proteína L1 es de tipo VPH específico y por lo tanto, la protección es principalmente de tipo específico. Esta vacuna previene infecciones persistentes y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) relacionadas con VPH 16 [39] .

### **Vacuna Bivalente**

Cervarix ® es una vacuna de subunidad, no infecciosa compuesta principalmente por VLPs, estas se autoensamblan a partir de las 360 copias de L1. Contiene las VLP de VPH 16 y 18, estos dos tipos causan el 70% de cáncer de cuello uterino en todo el mundo.

Se produce utilizando un nuevo sistema de expresión de baculovirus en células de *Trichoplusia*. Cada dosis de 0,5 ml de la vacuna bivalente contiene 20 µg de proteína L1 de VPH16 y 20 µg de proteína L1 de VPH18 adsorbida sobre un sistema adyuvante ASO4 patentado que contiene 500 µg de hidróxido de aluminio y 50 µg de 3-O-desacil-4 -monofosforil lípido A (MPL). MPL es una forma desintoxicada de lipopolisacárido

bacteriano y es un antagonista del receptor de tipo (TLR) -4. Los TLRs son una clase evolutivamente conservada de sensores del huésped de constituyentes microbianos que activan respuestas inmunes innatas y adaptativas a microbios invasores. Es de destacar que AS04 es el primer adyuvante de vacuna profiláctico que contiene agonistas de TLR para ser licenciado por los Estados Unidos (EE.UU.) Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)[40].

Esta vacuna está indicada para uso en mujeres desde la edad de 9 años. No se ha estudiado en varones.[41] Esta vacuna debe ser refrigerada, pero no congelada para su conservación.

### **Vacuna Tetravalente**

Gardasil®

Es una suspensión para inyección intramuscular que contiene proteínas virales purificadas para 4 tipos de VPH (6, 11, 16 y 18). Se produce utilizando un sustrato de levadura e incluye sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo como adyuvante. Cada dosis de 0,5 ml de esta vacuna contiene 20 µg de proteína L1 de VPH-6, 40 µg de proteína L1 de VPH-11, 40 µg de proteína L1 de VPH-16 y 20 µg de proteína L1 de VPH-18 adsorbida sobre 225 µg del adyuvante. Esta vacuna está indicada para uso en mujeres y hombres desde la edad de 9 años. [41]

### **Vacuna Nonavalente**

Gardasil9®

Para una mayor protección frente a los tipos de cáncer y lesiones asociados al VPH, se ha desarrollado la vacuna nonavalente que incluye los tipos: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52,58 que son los que ocasionan el 90% de cáncer en el cuello uterino, 80% lesiones cervicales de alto grado y 50% lesiones de bajo grado.

Una dosis de 0,5 ml de la 9vVPH contiene 30/40/60/40/20/20/20/20/20 µg de proteína L1 de los VPH tipo 6/11/16/18/31/33/45/52/58, respectivamente, y 500 µg de hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo, como adyuvante. Con el fin de evitar una menor inmunogenicidad debida a la interferencia inmunológica, las dosis incluidas de cada antígeno y adyuvante son superiores a las incluidas en la 4vVPH.

Adicionalmente, como excipientes contiene cloruro sódico, L-histidina, polisorbato 80 y borato sódico [42].

**Tabla 2. Composición de las vacunas contra el VPH.**

Composición de una dosis de 0,5 ml de la vacuna [31].

	Gardasil	Gardasil9	Cervarix
Cantidad en ug de proteína L1 de tipos oncogénicos			
VPH 16	40	60	20
VPH 18	20	40	20
VPH 31		20	
VPH 33		20	
VPH 45		20	
VPH 52		20	
VPH 58		20	
Cantidad en ug de proteína L1 de tipos verrugosos			
VPH 6	20	30	
VPH 11	40	40	
Componente de fabricación			
Cloruro de Sodio, mg	9,56	9,56	4,4
L-Histidina, mg	0,78	0,78	
Polisorbato 80, ug	50	50	
Borato de Sodio, ug	35	35	
Dihidrogenofosfato sódico dihidratado, mg			0,624
Adyuvante			
Sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo, ug	225	500	
3-O-Desacetil-4'-monofosforil lípido (MPL) A, ug, adsorbido sobre sal de hidróxido de aluminio,ug			50 500
Vector de expresión			
Cepa recombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	Levadura	
Células de insectos <i>Trichoplusia ni</i>			Baculovirus

### Efectividad de las vacunas profilácticas

La mayoría de las publicaciones se han concentrado en informar sobre la eficacia de la vacuna, que puede considerarse como el porcentaje de reducción en la probabilidad de un individuo de adquirir un punto final determinado si recibió la vacuna experimental frente al control. Sin embargo, en algunas de las publicaciones más recientes se habla sobre el análisis de la reducción de las tasas de enfermedad o de tratamiento, que generalmente se informa utilizando el denominador por 100 años-sujeto. Las reducciones de tasas a veces pueden ser indicadores más útiles del

potencial de impacto de una intervención sobre la salud. Es importante señalar que para los ensayos profilácticos de vacuna contra el VPH, ni la eficacia ni la reducción de la tasa son una medida absoluta del rendimiento de la vacuna.[40]

Más allá de la prevención sobre la enfermedad del VPH, también hay un creciente en la posibilidad de tratar el cáncer de cuello uterino establecido con enfoques de inmunoterapia. Los 2 oncogenes principales asociados con los cánceres conducidos por VPH, E6 y E7, se consideran excelentes dianas para la inmunoterapia.

Se han observado resultados prometedores con ensayos clínicos que incluyen vacunas terapéuticas contra el VPH, terapia con células T adoptivas e inhibidores de puntos de control, en los que los ensayos actualmente en curso examinan diversos enfoques combinados de inmunoterapia con tratamientos y aplicación de herramientas estándar [32].

### **1.5.2. Vacunas Terapéuticas de VPH**

La función de las vacunas terapéuticas es dirigir antígenos presentes en las células cancerosas, para el caso del cáncer inducido por VPH, los antígenos más frecuentes seleccionados son las proteínas E6 y E7, porque son oncogénicos y su expresión es necesaria para el mantenimiento del fenotipo canceroso [12]. La persistencia de las oncoproteínas E6 y E7 en la célula neoplásica se requiere para mantener su estado transformado [43]. Los vacunólogos contra el cáncer de cuello uterino tienen dos antígenos específicos de tumores (TSA) a los cuales se dirigen las estrategias de inducción de CTL específicas de VPH [34].

La expresión continua de las proteínas E6 y E7 en tumores humanos inducidos por VPH los convierte en dianas excelentes para la inmunoterapia específica de VPH, esto ha sido confirmado mediante modelos preclínicos en animales para tumores inducidos por VPH. Las plataformas de vacunas usadas para dirigir las proteínas de VPH en ensayos clínicos humanos incluyen terapias basadas en péptidos/ proteínas, terapias basadas en vectores virales, terapias basadas en ADN y terapias basadas en células dendríticas [12].

### **Tratamiento con péptidos/proteínas**

Diversos estudios han mostrado que la inmunización con péptidos derivados de VPH16 E7 han protegido a los ratones contra tumores positivos de VPH16. Las vacunas basadas en péptidos son atractivas debido a su facilidad de fabricación y la facilidad de monitoreo de la respuesta inmune, ya que pueden enfocarse en un único o pequeño número de determinantes [3], [44]. Sin embargo, las vacunas basadas en péptidos están restringidas por HLA, lo que limitaría su utilidad en las poblaciones humanas.

Debido a que los péptidos usualmente no son inherentemente inmunogénicos, requieren un inductor de respuestas inmunes innatas, es decir, un adyuvante. Este requisito puede conducir a reacciones inflamatorias locales y / o sistémicas inespecíficas. La aceptabilidad de estos tipos de efectos secundarios puede depender de la gravedad de la lesión objetivo, y los efectos secundarios graves serán casi con seguridad más aceptables en una vacuna contra el cáncer que en uno que se dirige a las displasias de bajo grado / infecciones productivas [45].

### **Tratamiento con vectores virales/bacterias**

La administración de antígenos de VPH en bacterias o sistemas de administración de virus recombinantes presenta un enfoque atractivo para la vacunación terapéutica [12]. Ofrece una ventaja sobre la inmunización de péptidos en que los epítomos de CTL pueden procesarse y presentarse naturalmente y pueden administrarse más eficazmente a las células diana. También tiene una ventaja sobre los enfoques basados en el ADN porque junto con el aumento de la eficiencia de la introducción de genes heterólogos en las células diana, los virus como la vacuna y el virus de la estomatitis vesicular o bacterias como *Listeria monocytogenes* son extremadamente inmunogénicos y proporcionan las "señales de peligro" para iniciar una respuesta inmune [12].

### **Tratamiento con ADN**

Uno de los desarrollos más importantes en la vaccinología y uno que tiene el potencial para revolucionar de nuevo el campo, es el uso de ácidos nucleicos como vacunas de subunidad. El método de vacunación es simple: las secuencias de ADN que

codifican una proteína de longitud completa o epítipo / epítopos antigénicos se clonan en un vector de expresión eucariótico, un plásmido bacteriano recombinante, y se inoculan en forma desnuda (es decir, sin proteínas asociadas) directamente en un animal.

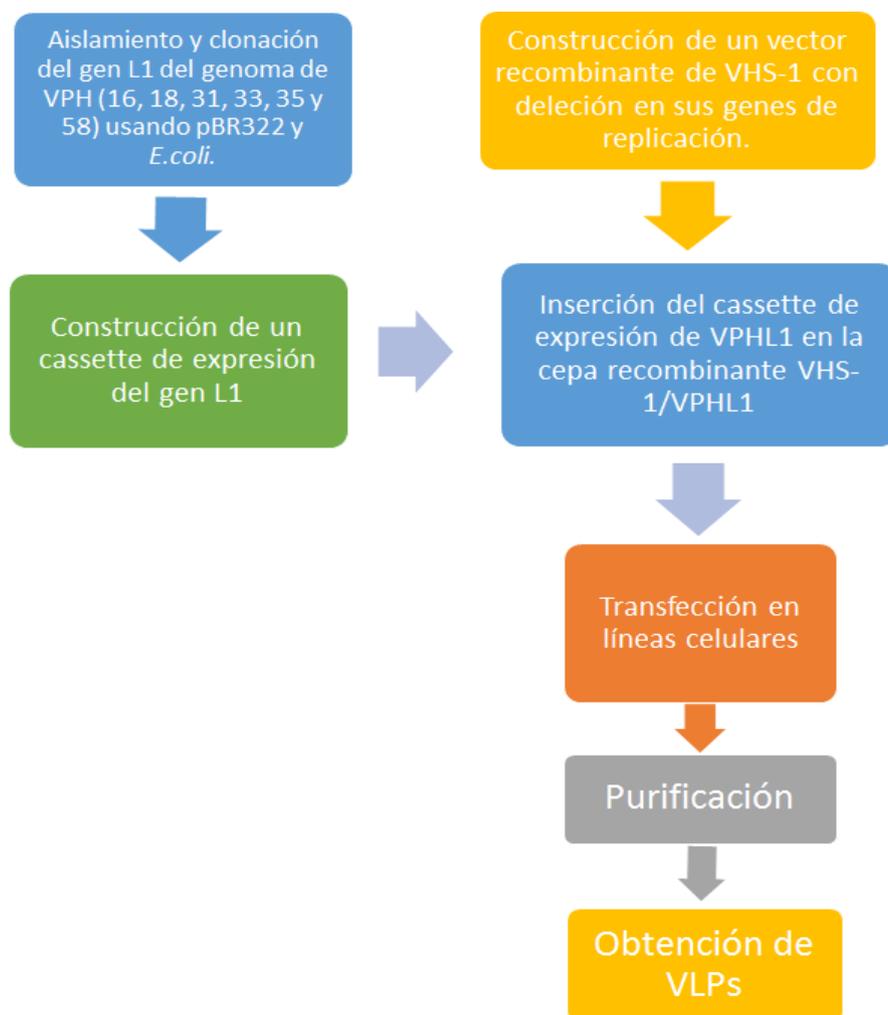
Alternativamente, se pueden usar transcritos de ARNm sintéticos. La expresión intracelular de una vacuna de plásmido (o ARN) se produce usando maquinaria de células hospedadoras normales. El antígeno se procesa entonces y se presenta al sistema inmune del huésped a través de vías celulares clásicas. Este proceso de inmunización ha sido descrito como vacunación con ADN, inmunización genética, inmunización con polinucleótidos y otros. Dado que el ARNm puede ser utilizado, así como el ADN con fines de vacunación, el término vacunación de ADN no abarca el espectro completo de posibilidades [34].

Las vacunas de ácido nucleico tienen varias características muy atractivas. En primer lugar, la construcción de vacunas es fácil y rápida, usando métodos recombinantes estándar. Puesto que las respuestas inmunes raramente se desarrollan contra el ADN plasmídico, se pueden desarrollar vectores estandarizados y optimizados para uso general.

La demostración más temprana de que los ácidos nucleicos podrían inducir respuestas biológicas cuando se suministran directamente al tejido vivo in vivo se produjo en la década de 1960 cuando Yoshei Ito y colegas demostraron que el ADN desnudo aislado de papilomas de conejo podría inducir nuevos papilomas después de la inoculación intracutánea en conejos ingenuos [35].

## CAPÍTULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 2.1** Diseño de la metodología para la elaboración de la vacuna hexavalente.

**Fuente:** Elaborado por los autores.

La metodología utilizada para la elaboración del diseño de la vacuna hexavalente del VPH se centra en la obtención de las partículas como virus (VLPs), las mismas que han sido probadas en diferentes ensayos clínicos como una de las alternativas más

efectivas para desarrollar una vacuna preventiva contra el VPH. Además, con la ayuda de los procedimientos moleculares respectivos, buscamos extraer la proteína objetivo a partir del genoma del virus.

A diferencia de las vacunas ya existentes, nosotros buscamos implementar una nueva ruta de producción de estas partículas, como son los vectores virales, los mismos que se ha comprobado que forman parte de nuevas estrategias en el desarrollo de vacunas de segunda generación.

Utilizar un vector viral para la producción de estas partículas, nos favorece en la producción más elevada de anticuerpos, y mucho más aún en utilizar un virus del cual el sistema inmune ya posee memoria, como es el caso del virus del Herpes 1.

En este capítulo presentamos de manera general los pasos para la elaboración de una vacuna para el VPH, presentamos una propuesta que está sujeta a variaciones al momento de realizar su fase experimental. Nuestra idea nace a partir de una exhaustiva revisión bibliográfica del tema y presenta la justificación la estrategia planteada.

## **2.1 Obtención de las muestras**

Las muestras utilizadas para este diseño serán muestras de ADN aislado de cada tipo de virus objetivo (16, 18, 31, 33, 35, 58), las mismas serán provistas por el INSPI (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública) y SOLCA (Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador) provenientes de ensayos clínicos anteriores de detección de VPH en mujeres de entre 17 y 84 años.

Estos virus fueron escogidos por su importancia debido a que se encuentran incluidos entre los 13 tipos de alto riesgo, junto con los VPH 16 y 18, los VPH 31, 33, 45, 52 y 58 son los genotipos de VPH más frecuentemente detectados en ICC (Cáncer Cervical Invasivo) y CIN (Neoplasia Cervical Intraepitelial) 2/3 en todo el mundo.

## **2.2 Obtención del gen L1 de los diferentes tipos de VPH**

A partir de la metodología propuesta por Hajmohammadi y Rassi, utilizando el VPH, se realizará el aislamiento y obtención de las proteínas objetivo.

A partir de las muestras de ADN aislado de cada uno de los tipos de VPH, se obtiene el gen específico L1 mediante la amplificación de la región que codifica para el gen, esto se realiza utilizando la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), y con la ayuda de los elementos necesarios.

Las enzimas de restricción que se obtendrán a partir de software NEBcutter 2.0 en el sitio web *NEB* (New England BioLabs: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), y también con la ayuda de cebadores o *Primers* específicos que codifican para cada gen amplifica la región necesaria creando múltiples copias.

Para los primers, se utilizarán las secuencias del gen L1 de cada tipo de VPH disponibles en el sitio web *PaVE* (*Papillomavirus Episteme*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y la secuencia de los cebadores iniciales (*Primer Forward*) y reversos (*Primer Reverse*) se obtienen a partir del sitio web *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Con la ayuda de un vector de clonación o plásmido, se inserta el producto de PCR transformando en *E.coli* DH5alfa y se obtienen múltiples colonias con el vector recombinante. Los plásmidos de clonación serán obtenidos del sitio web AddGene (<https://www.addgene.org/>).

### **Proteína L1**

Esta proteína es el principal componente de la cápside del virus del papiloma, ya que constituye aproximadamente el 80% de esta estructura viral. Cumple un rol importante en el ensamblaje del virus a la célula hospedadora e induce una respuesta inmune que brinda protección[46].

Es considerada como una proteína objetivo para el desarrollo de vacunas para prevenir infecciones causadas por el VPH, debido a que esta proteína tiene la capacidad intrínseca de acoplarse en estructuras vacías similares a la cápside, cuya inmunogenicidad es similar a los viriones infecciosos. Además se considera como una herramienta útil para realizar pruebas serológicas[47].

Los primeros intentos de generar vacunas basadas en L1 no tuvieron éxito, porque la L1 no estaba en su conformación nativa.[1] Sin embargo, otros estudios han demostrado que la expresión de esta proteína sola o con la proteína L2 en sistemas

recombinantes, forman partículas similares al virus. Cabe recalcar que esta proteína desempeña el papel predominante en la obtención de una respuesta del anticuerpo neutralizante, además la proteína L2 puede estar implicada en este proceso.[35]

### **2.3 Construcción del recombinante VHS-1/VPHL1**

La cepa de VHS-1 infecciosa, es purificada a partir de líneas celulares y luego transfectadas con el cassette de expresión que contiene la proteína L1, dentro del genoma de VHS-1 en los lugares donde se sitúa el gen UL54 usualmente. El cassette es insertado en sentido contrario a la replicación del genoma y va acompañado al gen reportero GFP.

#### **VHS-1 como vector recombinante**

Los herpesvirus son utilizados como vehículos para la transferencia de genes a células in vivo, basadas en su capacidad para persistir después de la infección primaria en humanos en un estado de latencia donde la enfermedad está ausente con estado inmune normal. Actualmente en el ámbito genético, el virus del herpes es utilizado con fines de transferencia génica. Una característica más atractiva es la eficacia infecciosa del HSV para un gran número de tipos de células, lo que resulta en la transducción génica eficiente. Infectividad eficiente y la transducción, ha hecho posible la administración repetida del vector incluso en huéspedes inmunes. Es por estas características que se utiliza este vector en el diseño [48].

VHS hace un vector de vacuna atractivo en la medida en que es altamente infeccioso para una gama de células huésped extremadamente amplia que activa el sistema inmune innato a través de receptores Toll-like. Las inserciones de ADN heterólogo en numerosos loci dentro de su genoma, puede infectar y expresar el antígeno dentro de las células no divisorias, y produce altos títulos.

El VHS induce una respuesta inmune duradera, e incluso los mutantes defectuosos a la replicación inducen una inmunidad prolongada. Estos últimos se producen en la construcción de vectores recombinantes de VSH donde se suprimen cuatro genes inmediatos tempranos, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, y se reemplazan por las proteínas de interés que expresen el antígeno necesario [49].

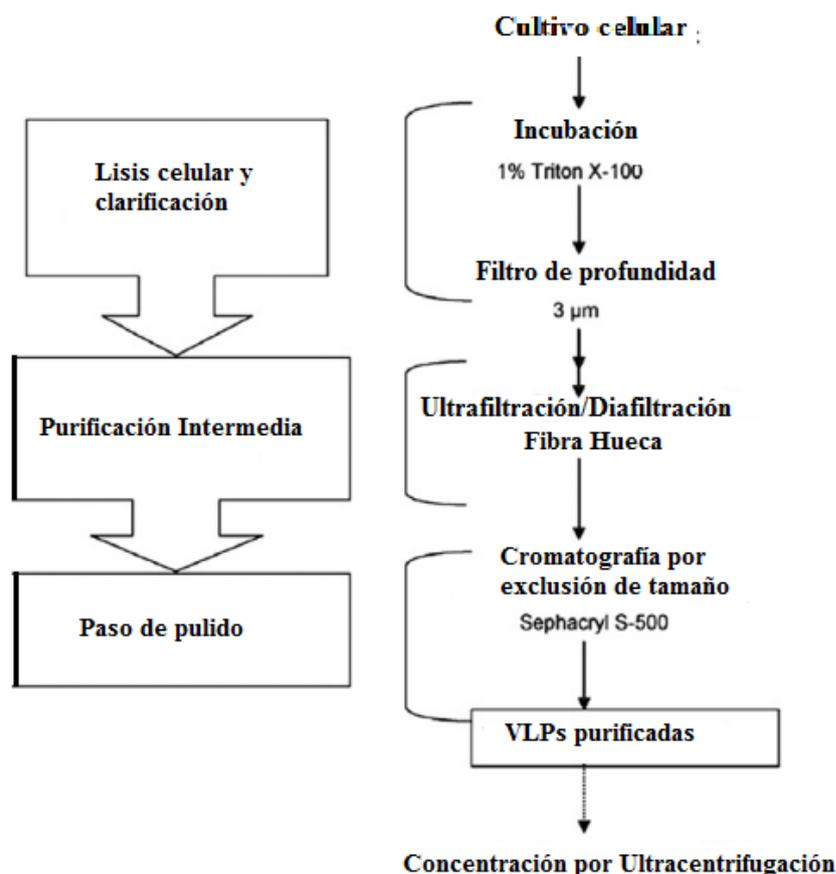
## **2.4 Transfección Celular**

Varios métodos para la transfección de ácidos nucleicos se han desarrollado utilizando DEAE-dextrano, fosfato cálcico, electroporación, liposomas, lípidos no liposómicos y dendrímeros activados. La elección de la tecnología de transfección puede influir fuertemente en la eficiencia de la transfección. Idealmente, la transfección debe ser rápida y fácil de realizar, dar altas eficiencias y resultados reproducibles, y causar una citotoxicidad mínima.

## **2.5 Purificación de las VLPs**

Para utilizar las VLP como vacunas, la eficacia y la seguridad son esenciales; por lo tanto, la pureza, la potencia y la consistencia se vuelven cruciales. Lo más importante a considerar es que la partícula no posea ningún tipo de contaminación del vector que las producía, y que tampoco posea restos de ADN del virus.

Esta metodología fue utilizada a partir de Vicente et. al. 2011 *Large-scale production and purification of VLP-based vaccines*.



**Figura 2.2: Esquema de la purificación de VLPs.**

Fuente: [50].

### **Partículas como virus (VLPs)**

Estas partículas son el componente principal para las vacunas del VPH, ya que poseen la capacidad de no ser infecciosa y tampoco es oncológica. Son capaces de estimular las respuestas inmunes mediadas por células B, asimismo es muy eficaz en la estimulación de CD4 proliferativas y linfocitos T citotóxicos. Esta característica brinda una mayor eficacia a las vacunas que parten de VLP. Por lo tanto, la adición de VLP como estrategia para elaboración de vacunas para cualquier tipo de enfermedad, puede ser usada.[1]

Las VLP por sí mismas, sin la adición de adyuvantes, son capaces de inducir respuestas CTL en ratones, así se sugiere que podrían ser utilizados como un vehículo para proveer otras proteínas virales expresadas tempranamente en el ciclo

de vida del virus. Por otra parte se ha demostrado recientemente la viabilidad de producir quimeras de VLP con proteínas E y fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpo VLP-específica y neutralizante.[35]

Las vacunas elaboradas a partir de VLPs no carecen de inconvenientes, sin embargo se necesitan dosis con concentraciones más altas de antígeno y esto a menudo es necesario para tener el mismo efecto protector que una vacuna con un virus inactivado o atenuado.[51]

Existen varias técnicas para la producción de VLPs. Las primeras fueron producidas utilizando baculovirus recombinante y virus vaccinia, esta técnica es muy versátil ya que varios baculovirus recombinantes que tienen los genes de interés son utilizados para infectar células de insecto y de esta manera generar grandes cantidades de la proteína vírica. [50]

La expresión de proteínas estructurales víricas, puede resultar en el ensamblaje de VLPs en diferentes sistemas de expresión, tales como *Escherichia coli*, células de insectos, células de levadura y células de mamífero. [52]

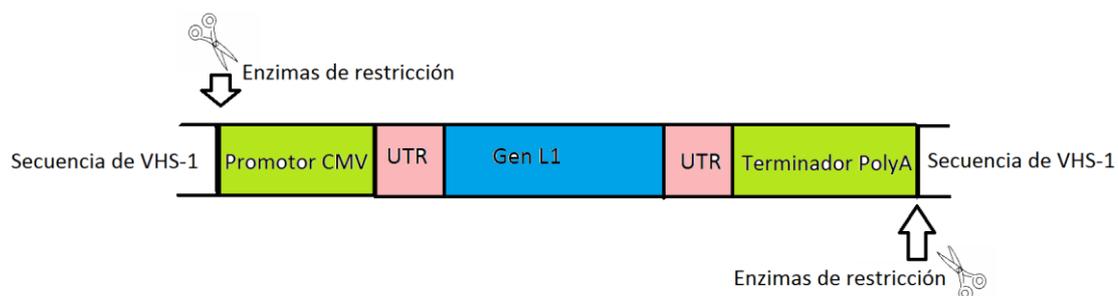
## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS ESPERADOS

#### 3.1.1. Diseño de una cassette de expresión

Utilizando la tecnología de ADN recombinante, y los elementos necesarios para la obtención del gen que expresa la proteína de la cápside, se diseñó un cassette de expresión que se insertará en el genoma del VHS-1.

Este cassette presenta los componentes necesarios para que pueda expresar la proteína de interés, mediante el proceso de transcripción, dentro de las células que serán transfectadas.



**Figura 3.1** Cassette de expresión VHS-1/VHP

Cassette de expresión a ser insertado dentro del genoma del VHS-1.

**Fuente:** Elaborado por los autores

Las enzimas de restricción que se obtienen *in silico* sirven para cortar los sitios específicos del gen y las mismas sirven para insertarlo dentro del genoma del VHS-1.

#### 3.1. Construcción de un vector recombinante de VHS-1

La biología del virus del Herpes presenta características que pueden ser utilizadas como estrategias en la elaboración de vacunas [53]:

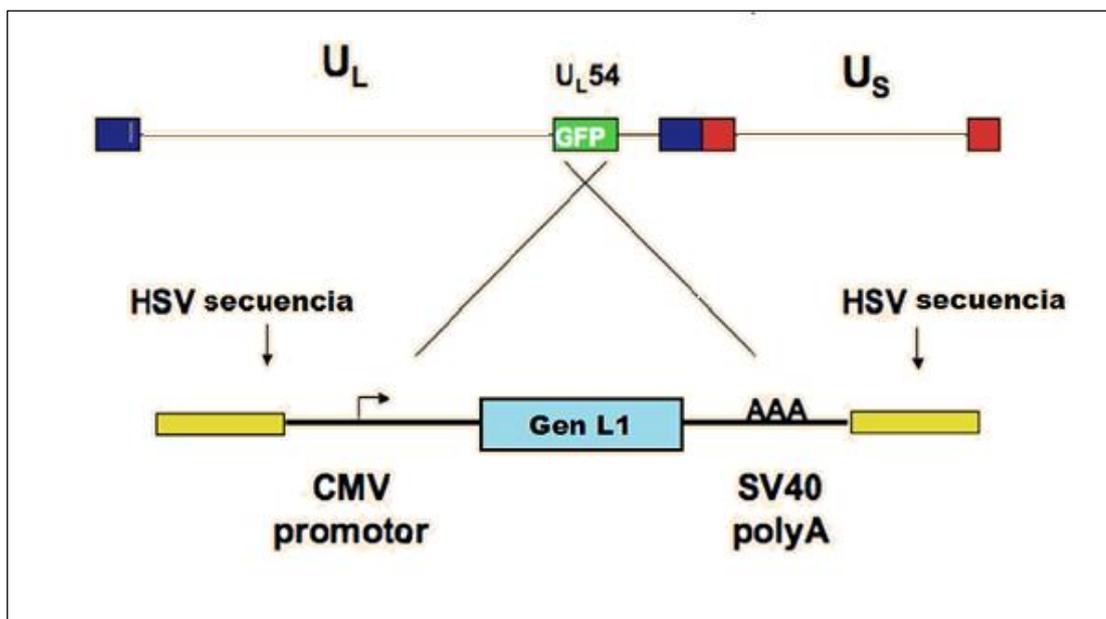
- VHS tiene una amplia gama de células huésped
- Los vectores VHS son altamente infecciosos.

- Las células no divisorias pueden transducirse eficientemente y expresan transgenes.
- De los 84 genes virales conocidos, aproximadamente la mitad no son esenciales para el crecimiento en el cultivo de tejidos. Esto significa que varios o grandes transgenes terapéuticos pueden ser acomodados, mediante la sustitución de genes víricos dispensables.
- El VHS-1 defectivo recombinante puede ser fácilmente preparada a alto título y pureza sin contaminación de recombinantes de tipo salvaje.

La delección de uno u otro de los genes inmediatos-tempranos esenciales (ICP4, ICP27) da como resultado un virus que no puede replicarse, excepto en células que complementan las mutaciones nulas proporcionando ICP4 o ICP27 en trans. Sin embargo, en las líneas celulares complementarias apropiadas, el virus es capaz de replicarse. Mediante el uso de este método, es posible preparar stocks virales de alta concentración que estén libres de virus contaminantes de replicación. Además, la manipulación genética de estos virus es relativamente sencilla, explotando las propiedades recombinógenas de VHS-1 para introducir secuencias exógenas mediante recombinación homóloga. In vivo, estos virus se convierten en cascadas abortivas de transcripción de genes líticos, resultando en un estado que es muy similar a la latencia [53].

Conociendo la utilidad de este virus como vector potencial para su uso en el desarrollo de vacunas, se obtiene el diseño a implementar como solución a nuestro problema. Proponemos este diseño como una alternativa al desarrollo de vacunas contra el VPH, principalmente en el desarrollo de las vacunas preventivas, en contraste con las

metodologías ya existentes en el mercado, promoviendo más estudios experimentales sobre el tema.



**Figura 3.2: Diseño del vector recombinante viral incluyendo el sitio de inserción del gen L1.**

**Fuente:** Elaborado por los autores

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

1. Esta vacuna está diseñada con cepas de VPH de alto riesgo de Ecuador, favoreciendo a hombres y mujeres que padezcan esta enfermedad.
2. El diseño de esta vacuna difiere con las vacunas comerciales debido a que el VHS-1 es utilizado como vector debido a que induce una inmunidad prolongada.
3. Una de las ventajas de utilizar este tipo de vector como el VHS-1 es que pueden acomodar grandes fragmentos de ADN extraño (teóricamente hasta 152 kb), y no son citotóxicos.
4. Este tipo de vector, puede propagarse eficazmente con facilidad en cultivos celulares y por lo tanto son vacunas rentables. De esta manera, la población tendría mayor accesibilidad a este método preventivo.
5. Las VLPs poseen un enorme potencial como vacunas candidatas. Este diseño propone una profilaxis eficaz pero más segura que las vacunas virales, gracias a estos innovadores biofarmacéuticos.
6. Las VLPs se van a obtener por medio de purificación de células Vero, a diferencia de las vacunas aprobadas por la FDA que se obtienen a partir de levadura, *E.coli* o baculovirus.
7. Puesto que el cassette de expresión mejora la especificidad y optimiza la expresión de la proteína L1 y además libera los VLPs, es importante incluirlo en este diseño de vacuna profiláctica.
8. Se espera que este diseño de vacuna aporte como una posible solución e intervenga de manera eficaz y efectiva para el control de infecciones causadas por los tipos de VPH estudiados, en la población ecuatoriana.
9. La obtención de las VLPs del gen de la cápside es eficiente para producir anticuerpos sin necesidad del ADN viral.

## Recomendaciones

1. En el proceso de purificación de las VLPs, se debe tener en cuenta que estas partículas generalmente miden menos de 200 nm, por esto los materiales utilizados en este proceso deben ser evaluados para minimizar la pérdida del producto.
2. Se deben realizar varios ensayos inmunogénicos de las vacunas contra el VPH ya que ofrecen una oportunidad única para identificar las características y mecanismos de la respuesta inmune y como se relaciona con la efectividad de la vacuna.
3. Por ser este un diseño y no tener fase experimental, se pueden omitir sugerencias o advertencias que sean de suma importancia en el desarrollo de este tipo de vacuna. Sin embargo, se logra aportar con el desarrollo de una nueva solución para la prevención de estas enfermedades en el Ecuador.
4. Son necesarios más estudios sobre vacunas de VPH para aumentar la calidad de vida de personas con cáncer de cuello uterino.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Garcea and D. DiMaio, *The Papillomaviruses*. 2007.
- [2] L. Studer and G. Cardoza-Favarato, *Human Papillomavirus*. 2017.
- [3] R. Garcea and D. Di Maio, *The papilloma viruses*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [4] D. Bzhalava, C. Eklund, and J. Dillner, “International standardization and classification of human papillomavirus types,” *Virology*, vol. 476, no. 2015, pp. 341–344, 2017.
- [5] L. Lee and S. M. Garland, “Human papillomavirus vaccination: the population impact,” *F1000Research*, vol. 6, no. 0, p. 866, 2017.
- [6] A. Ferenczy and E. L. Franco, “Prophylactic human papillomavirus vaccines : potential for sea change,” pp. 511–525, 2007.
- [7] S. Bellone, S. Pecorelli, M. J. Cannon, and A. D. Santin, “Advances in dendritic cell-based therapeutic vaccines for cervical cancer,” pp. 1473–1486, 2007.
- [8] C. R. Brown *et al.*, “Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening clinic,” vol. 42, pp. 629–636, 2009.
- [9] M. L. Tornesello *et al.*, “A Pilot Study on the Distribution of Human Papillomavirus Genotypes and HPV-16 Variants in Cervical Neoplastic Lesions From Ecuadorian Women,” vol. 1965, no. July, pp. 1959–1965, 2008.
- [10] L. Narváez, F. Loayza, M. Narváez, X. Vega, P. Vargas, and K. Sáenz, “Detección de virus del papiloma humano en muestras de hisopados vaginales por autotoma,” *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, vol. 62, no. 1, pp. 5–10, 2015.
- [11] M. E. Harden and K. Munger, “Human papillomavirus molecular biology,” *Mutat. Res. Mutat. Res.*, p. , 2016.
- [12] S. Kanodia, D. M. Da Silva, and W. M. Kast, “Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions,” *Int. J. Cancer*, vol. 122, no. 2, pp. 247–259, 2008.

- [13] A. García Carrancá and S. C. Galván, "Vaccines against human papillomavirus: perspectives for controlling cervical cancer," *Expert Rev. Vaccines*, vol. 6, no. 4, pp. 497–510, 2007.
- [14] T. Ramqvist, K. Andreasson, and T. Dalianis, "Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 7, no. 7, pp. 997–1007, 2007.
- [15] G. Cecchini, G. Paganini, M. D'Amico, M. Cannone, C. Bertuletti, and M. C. P. Barberis, "Cervical cancer screening programs in low-income communities. Experiences from Ecuador. Low cost detection of HPV infection in a developing country," *Pathologica*, vol. 101, no. 2, pp. 76–79, 2009.
- [16] L. Gissmann, H. Pfister, and H. Zur Hausen, "Papilloma Viruses ( HPV ): Characterization Isolates of Four Different," *Virology*, vol. 76, pp. 569–580, 1977.
- [17] G. Orth, S. Jablonskat, M. Favre, O. Croissant, M. Jarzabek-chorzelskat, and G. Rzesat, "Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 75, no. 3, pp. 1537–1541, 1978.
- [18] A. Meisels and R. Fortin, "Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic Patterns," *Acta Cytol*, vol. 20, pp. 505–509, 1977.
- [19] F. J. Ochoa-carrillo, "Virus del papiloma humano . Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna . Parte I / III," *Gac. Mex. Oncol.*, vol. 13, no. 5, pp. 308–315, 2014.
- [20] M. Dürst, L. Gissmann, H. Ikenberg, and H. zur Hausen, "A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 80, no. 12, pp. 3812–3815, 1983.
- [21] M. Boshart, L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen, and H. zur Hausen, "A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer.," *EMBO J.*, vol. 3, no. 5, pp. 1151–7, 1984.

- [22] J. M. M. Walboomers *et al.*, "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide," *J. Pathol.*, vol. 189, no. 1, pp. 12–19, 1999.
- [23] I. Jelcic, A. Hotz-wagenblatt, A. Hunziker, H. Hausen, and E.-M. De Villiers, "Isolation of Multiple TT Virus Genotypes from Spleen Biopsy Tissue from a Hodgkin ' s Disease Patient : Genome Reorganization and Diversity in the Hypervariable Region," *J. Virol.*, vol. 78, no. 14, pp. 7498–7507, 2004.
- [24] C. Vera-Uehara, M. A. Sánchez-Alemán, F. J. Uribe-Salas, J. Ramos-Castañeda, M. L. Olamendi-Portugal, and C. J. Conde-Glez, "HPV infection, risk factors and viral load among Mexican male college students.," *Braz. J. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 1, pp. 71–6, 2014.
- [25] M. Guo *et al.*, "Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma," *Mod. Pathol.*, vol. 20, no. 2, pp. 256–266, 2007.
- [26] K. Morshed, D. Polz-Gruszka, M. Szymański, and M. Polz-Dacewicz, "Human Papillomavirus (HPV) - Structure, epidemiology and pathogenesis," *Otolaryngol. Pol.*, vol. 68, no. 5, pp. 213–219, 2014.
- [27] K. A. Ault, "Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract," *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, vol. 2006, no. Figure 1, pp. 1–5, 2006.
- [28] J. Cabrera, C. Oswaldo, C. Manuel, and J. Ortiz, "Prevalencia de Genotipos del Virus del Papiloma Humano en Mujeres en Edad Fértil en Ecuador," *Maskana*, vol. 1, no. 1, pp. 1–32, 2015.
- [29] C. R. Brown *et al.*, "Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening clinic," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 42, no. 7, pp. 629–636, 2009.
- [30] F. González-Andrade and D. Sánchez, "HPV genotyping in anogenital abnormal samples of Ecuadorian women," *Cancer Biomarkers*, vol. 5, no. 4–5, pp. 225–232, 2009.
- [31] A. G. Carrancá and S. C. Galván, "Vaccines against human papillomavirus :

- perspectives for controlling cervical cancer,” pp. 497–510, 2007.
- [32] W. Small *et al.*, “Cervical cancer: A global health crisis,” *Cancer*, vol. 123, no. 13, pp. 2404–2412, 2017.
- [33] G. Gross, “HPV-vaccination against cervical carcinoma : will it really work?,” pp. 121–125, 2007.
- [34] R. W. Tindle, *Vaccines for Human Papillomavirus Infection and Anogenital Disease*, II Series. Herston, Queensland, 1999.
- [35] R. W. Tindle and EBSCOhost., *Vaccines for human papillomavirus infection and anogenital disease*. 1999.
- [36] G. Gross, “HPV-vaccination against cervical carcinoma: Will it really work?,” *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 196, no. 3, pp. 121–125, 2007.
- [37] S. Bellone, S. Pecorelli, M. J. Cannon, and A. D. Santin, “Advances in dendritic cell-based therapeutic vaccines for cervical cancer,” *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 7, no. 10, pp. 1473–1486, 2007.
- [38] A. Atkinson, K. Schmidt, S. Fielding, S. Kawaguchi, and P. A. Geissler, “Variable food absorption by Antarctic krill: Relationships between diet, egestion rate and the composition and sinking rates of their fecal pellets,” *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 59–60, pp. 147–158, 2012.
- [39] S. Pils and E. A. Joura, “From the monovalent to the nine-valent HPV vaccine,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 21, no. 9, pp. 827–833, 2015.
- [40] C. Cerqueira and J. T. Schiller, “Papillomavirus assembly: An overview and perspectives,” *Virus Res.*, vol. 231, pp. 103–107, 2017.
- [41] WHO, “Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014,” *World Heal. Organ. Wkly. Epidemiol. Rec.*, vol. 89, no. 43, pp. 465–492, 2014.
- [42] F. X. Bosch, D. Moreno, E. Redondo, and A. Torné, “Vacuna nonavalente frente al virus del papiloma humano. Actualización 2017,” *Semer. - Med. Fam.*, vol. 43, no. 4, pp. 265–276, 2017.
- [43] M. Knebel Doeberitz, C. Rittmuller, F. Aengeneyndt, P. Jansen-durr, and D.

- Spitkovsky, "Reversible Repression of Papillomavirus Oncogene Expression in Cervical Carcinoma Cells: Consequences for the Phenotype and E6-p53 and E7-pRB Interactions," *J. Virol.*, vol. 68, no. 5, pp. 2811–2821, 1994.
- [44] R. B. Salit, W. M. Kast, and M. P. Velders, "Ins and outs of Clinical Trials with Peptide-Based Vaccines," *Front. Biociencia*, vol. 7, no. e204-213, p. 10, 2002.
- [45] L. Muderspach *et al.*, "A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 3406–3416, p. 10, 2000.
- [46] V. A. Vanegas, B.; Arleth, I. Rubio, A. M. Bedoya, and G. I. Sánchez, "ESTRUCTURA MOLECULAR Y ANTIGÉNICA DE LA VACUNA CONTRA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO 16 (VPH 16) Antigenic and Molecular Structure of Human Papillomavirus (HPV) 16 Vaccine," *Acta biol. Colomb*, vol. 13, no. 3, pp. 37–48, 2008.
- [47] R. Kimbauer, F. Booyt, N. Chengt, D. R. Lowy, and J. T. Schiller, "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic," *Med. Sci.*, vol. 89, no. December, pp. 12180–12184, 1992.
- [48] M. Kay, J. Glorioso, and L. Naldini, "Viral vectors for gene therapy. the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics," *Nat. Med.*, vol. 7, pp. 33–40, 2001.
- [49] R. H. Lachmann, "Herpes simplex virus-based vectors," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 85, no. 4, pp. 177–190, 2004.
- [50] T. Vicente, A. Roldão, C. Peixoto, M. J. T. Carrondo, and P. M. Alves, "Large-scale production and purification of VLP-based vaccines," *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 107, no. SUPPL., pp. S42–S48, 2011.
- [51] R. Noad and P. Roy, "Virus-like particles as immunogens," *Trends Microbiol.*, vol. 11, no. 9, pp. 438–444, 2003.
- [52] H. Y. Li, J. F. Han, C. F. Qin, and R. Chen, "Virus-like particles for enterovirus

71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potently elicits protective immune responses in mice,” *Vaccine*, vol. 31, no. 32, pp. 3281–3287, 2013.

- [53] E. A. Burton, D. J. Fink, and J. C. Glorioso, “Gene delivery using herpes simplex virus vectors,” *DNA Cell Biol*, vol. 21, no. 12, pp. 915–936, 2002.