

# Generalidades sobre las partículas similares al Virus del Papiloma Humano

**Jorge Félix Beltrán-Lissabet.**

Departamento de Bioquímica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave 25 y 158 apartado postal 6414, La Habana,  
jorge.beltran@cnic.edu.cu

Recibido: 17 de septiembre de 2013.

Aceptado: 12 de diciembre de 2013.

Palabras clave: *PSV, VPH, L1, Gardasil, Cervarix.*

Key words: VLP, HPV, L1, Gardasil, Cervarix.

**RESUMEN.** El virus del papiloma humano provoca (VPH) una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes a nivel mundial que afecta aproximadamente a 500 000 mujeres cada año. La proteína L1 se encuentra marcadamente conservada entre los diferentes tipos del VPH, y tiene la capacidad de autoensamblarse formando partículas similares a virus (PSV) que presentan una elevada inmunogenicidad. El uso de PSV recombinantes como inmunógenos, se ha incrementado en los últimos años. Las dos vacunas profilácticas actuales contra el VPH (Gardasil y Cervarix) están basadas en PSV, las cuales han resultado muy eficaces. Existen disímiles estrategias encaminadas a la obtención de PSV, entre las que se destacan las modificaciones genéticas, la selección idónea de un sistema de expresión y la optimización de los métodos de purificación. Pese a los resultados en las investigaciones en el campo del desarrollo de PSV del VPH, aún queda mucho por hacer, debido a la influencia de disímiles variables desconocidas que afectan la organización y la actividad biológica de este complejo macromolecular. La purificación de la proteína L1 constituye una etapa clave durante la obtención PSV del VPH, que depende de la estrategia de purificación utilizada. El desarrollo de PSV quiméricas del VPH se ha convertido en una prometedora estrategia que permite el desarrollo de una repuesta humoral heterogénea contra las infecciones provocadas por los diferentes tipos del VPH. Aunque se ha avanzado en las investigaciones encaminadas al desarrollo de las PSV del VPH, aún existen muchas variables desconocidas que influyen de manera desconocida en el ensamblaje macromolecular de estas estructuras.

**ABSTRACT.** Human papillomavirus causes one of the most common worldwide sexually transmitted diseases, which affect approximately 500 000 women each year. L1 protein is highly conserved among different HPV types, and has the ability to self assemble into VLP which have a high immunogenicity. The use of recombinant VLP as immunogens has increased in recent years. The two current prophylactic HPV vaccines (Gardasil and Cervarix) are based on PSV which have proven very effective. There are dissimilar strategies to obtain VLP, including genetic modifications, the selection of a suitable expression system and optimization of purification methods. Despite the results of research in the field of developing HPV VLP, there is still much to do, due to the dissimilar influence of unknown variables that affect the organization and biological activity of this macromolecular complex. Purification of L1 protein is a key step in the preparation of HPV VLPs, which depends on the purification strategy used. Developing chimeric HPV VLPs it has become a promising strategy that allows the development of a heterogeneous humoral response against infections caused by different HPV types. Although progress has been made in researches aimed at developing HPV VLP, there are still many unknown variables that have influence over the macromolecular assembly of these structures.

## INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es una de las causas más comunes de enfermedades de transmisión sexual en hombres y mujeres en todo el mundo, con niveles de prevalencia que varían con los estudios de población y localización geográfica.<sup>1</sup> Las mujeres son más vulnerables a adquirir la infección por el VPH y generalmente, son infectadas por varias de sus cepas. Al menos 14 tipos de los VPH están clasificados como de gran riesgo oncogénico, de los cuales los tipos VPH-16 y VPH-18 causan alrededor del 70 % de todos los cánceres cervicales, afectando aproximadamente a 500 000 mujeres cada año.<sup>2</sup> El VPH está también relacionado con la aparición de otros tipos de cánceres entre los que figuran el del ano y el pene, además de los cánceres extra genitales de cabeza y cuello.<sup>3</sup>

Las partículas similares a virus (PSV) están formadas por proteínas virales estructurales que tienen una inherente propiedad de autoensamblaje, imitando la morfología del patógeno. A diferencia de los virus nativos, las PSV no se replican ni infectan la célula hospedera, ya que están esencialmente desprovistas del material genético. Las PSV representan un gran avance en el desarrollo de vacunas de subunidades debido a su elevada inmunogenicidad.<sup>4</sup>

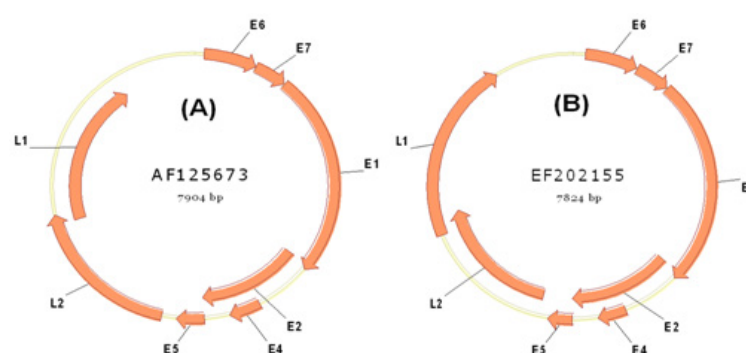
La infección provocada por el VPH puede ser prevenida por las vacunas profilácticas basadas en PSV. Pese a la existencia de las dos vacunas profilácticas contra el VPH (Gardasil y Cervarix), basadas en PSV de los VPH-18, VPH-16, VPH-11 y VPH-6 para el caso de GARDASIL y VPH-18 y VPH-16 para CERVARIX;<sup>5,6</sup> se hace necesario seguir avanzando en la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan un mejor desarrollo de estas estructuras, con vistas al diseño de futuras vacunas que puedan combatir las infecciones provocadas por el virus.

Si bien las dos vacunas profilácticas actuales contra el VPH han contribuido a combatir las infecciones provocadas por el virus, ellas no garantizan la protección contra otros tipos del VPH,<sup>7</sup> por consiguiente, la incorporación de PSV de otros tipos virales en las formulaciones vacunales futuras, es de suma importancia y ello dependerá en gran medida de la elucidación de los problemas que se presentan durante las distintas estrategias de purificación de PSV. Dada la importancia de las PSV del VPH en el desarrollo de vacunas profilácticas, el objetivo del presente trabajo consistió en abordar de manera general los aspectos a tener en cuenta durante la producción y manipulación de las PSV del VPH.

### CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VPH

El VPH es un virus no envuelto relativamente pequeño que contiene un genoma de doble cadena de ADN circular asociado a proteínas similares a histonas y protegido por una cápsida con simetría icosaédrica formada por dos tipos de proteínas. La cápsida está compuesta por 72 capsómeros, cada uno compuesto a su vez por cinco monómeros de 55 kDa de la proteína mayoritaria de la cápsida L1. Los pentámeros de L1 están distribuidos formando una red de interacciones disulfuro intra e interpentaméricas, la cual contribuye con la estabilización de la cápsida.<sup>4</sup> La proteína L2 es el componente secundario de la cápsida viral con un peso molecular aproximado de 75 kDa.<sup>8,9</sup>

El genoma del VPH es de aproximadamente 8 kb con un promedio de ocho marcos abiertos de lectura (MAL) divididos en tres regiones (Fig.1).

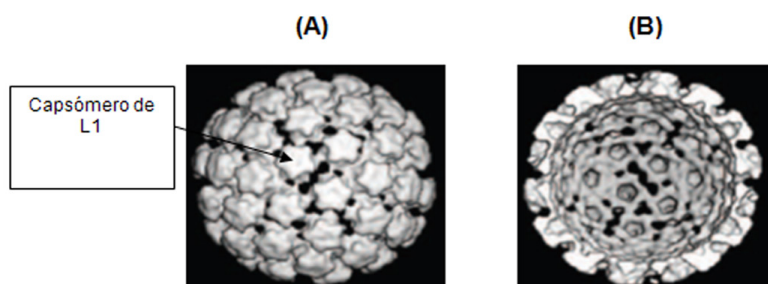


**Fig.1.** MAL de los VPH-16 y VPH-18, determinados con la ayuda del programa bioinformático NTI vector. (A) MAL del VPH-16, (B) MAL del VPH-18.<sup>10,11</sup>

La primera es una región larga, la cual tiene la función de regular la transcripción de los genes virales E6 y E7; la segunda es una región temprana que consiste en seis MAL: E1, E2, E4, E5, E6 y E7, los cuales codifican las proteínas no estructurales implicadas en la oncogénesis y replicación viral. La tercera es una región tardía, que codifica las proteínas estructurales L1 y L2.<sup>1</sup>

### PARTÍCULAS SIMILARES A VIRUS

Existen dos descripciones divergentes sobre las PSV. La primera es la histórica o clásica descripción, en la cual la PSV es vista meramente como un ensamblaje de proteínas estructurales, organizadas en subestructuras (capsómeros), que además, se organizan para formar una partícula (cápsida) (Fig. 2).<sup>12</sup> Las PSV son complejos multiméricos de proteínas que imitan la conformación y organización de los virus nativos, dicha estructura presenta un rango de dimensiones comprendidas entre 22 y 200nm, o más en algunos casos, en dependencia de la proteína viral implicada en el proceso de ensamblaje.<sup>13</sup>



**Fig.2.** Reconstrucción computarizada en tres dimensiones de la cápsida del VPH solo con la proteína L1 (PSV). Imagen de la superficie (A), e interior de la cápsida viral (B).<sup>8</sup>

Las PSV son utilizadas directamente como cápsidas<sup>14</sup> vacías, o pueden ser empaquetadas *ex vivo* con una carga de interés, más comúnmente el empaquetamiento se produce con ADN, proteínas o una pequeña molécula terapéutica. En estos casos, la PSV es

un ensamblaje macromolecular de proteínas incompetente para la replicación, que puede ser creada a partir de proteínas estructurales auto ensambladas de fagos y virus.<sup>15</sup> La otra descripción incluye un conjunto de biomoléculas que forman una partícula (Ej: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) con una estructura similar a la de un virus, que a su vez, no puede ser técnicamente descrita como un virus. Este término está siendo aplicado a las partículas que completan una limitada replicación y empaquetamiento *in vivo* de los genomas virales o factores del hospedero, tales partículas son denominadas pseudovirus.<sup>16</sup> El descubrimiento que abrió paso al desarrollo de las vacunas profilácticas contra el VPH, lo constituyó el hallazgo de que la proteína L1 podía autoensamblarse en una PSV que es estructural y antigénicamente muy similar a los viriones auténticos. Después de la inmunización con PSV del VPH, se pueden generar grandes niveles de anticuerpos neutralizantes.<sup>17</sup> Estos anticuerpos neutralizantes son marcadamente específicos.<sup>18</sup> El análisis de las secuencias de varios VPH muestra un grado de homología entre las proteínas L1 de diferentes tipos del VPH. (Fig.3) A pesar de la similitud, la respuesta de anticuerpos tipo específica ha sido bien documentada en estudios sobre infecciones genitales provocadas por el VPH, así como en modelos experimentales animales.

|          |                                                                      |                                     |     |
|----------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----|
|          | 1                                                                    |                                     | 50  |
| VPH-16   | -----                                                                |                                     |     |
| VPH-18   | MCLYTRVLILHYHLLPLYGPLYHPQPLPLHSILVY                                  | MVHIIICGHYIILFL                     |     |
| VPH-31   | -----                                                                |                                     |     |
| Consenso |                                                                      | <u>M</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>F</u> |     |
|          | 51                                                                   |                                     | 100 |
| VPH-16   | -----MSLWLPSEATVYLPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGT                          |                                     |     |
| VPH-18   | RNVNVFPIFLQMALWRPSDNTVYLPVPFVARVNTDDYVTRTSIFYHAGS                    |                                     |     |
| VPH-31   | NDVNVYHIFQMSLWLPSEATVYLPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGT                     |                                     |     |
| Consenso | <u>VNVF</u> <u>IF</u> <u>QMSLWLPSEATVYLPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGT</u> |                                     |     |
|          | 101                                                                  |                                     | 150 |
| VPH-16   | SRLLAUGHYPYFPIKKPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTS                   |                                     |     |
| VPH-18   | FRLLTVGPNPYFRVPAGGGNKQDIPKVSAYQYRVFRVQLPDPNKGFLPDTS                  |                                     |     |
| VPH-31   | SRLLAUGHYPYFPIKKPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIYLPDPNKGFPDTS                   |                                     |     |
| Consenso | <u>SRLLAUGHYPYFPIKKPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTS</u>            |                                     |     |
|          | 151                                                                  |                                     | 200 |
| VPH-16   | FYNPDTQRLVWACVGVEVGRGQPLGVGISGHPLLNLKLDDETENASAYAANA                 |                                     |     |
| VPH-18   | IYNPETQRLVWACAGVEIGRGQPLGVGLSGHPFYKNLDDTESSPAATSNV                   |                                     |     |
| VPH-31   | FYNPDTQRLVWACVGVEVGRGQPLGVGISGHPLLNLKLDDETENASAYAANA                 |                                     |     |
| Consenso | <u>FYNPDTQRLVWACVGVEVGRGQPLGVGISGHPLLNLKLDDETENASAYAANA</u>          |                                     |     |
|          | 201                                                                  |                                     | 250 |
| VPH-16   | GVDNRECISMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPCTNVAVNPGDCPPLE                   |                                     |     |
| VPH-18   | SEDVRDNVSVYKQTQLCILGCAPAIGEHWAKGTACKSRPLSQGDCPPLE                    |                                     |     |
| VPH-31   | GVDNRECISMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPCANNVAVTPGDCPPLE                  |                                     |     |
| Consenso | <u>GVDNRECISMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPC</u> <u>NVAVSPGDCPPLE</u>     |                                     |     |
|          | 251                                                                  |                                     | 300 |
| VPH-16   | LINTVIQDGMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVS                    |                                     |     |
| VPH-18   | LKNTVLEDGDMVDTGYGAMDFSTLQDTKCEVPLDICQSICKYPDYIQMSA                   |                                     |     |
| VPH-31   | LINTVIQDGMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVS                    |                                     |     |
| Consenso | <u>LINTVIQDGMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVS</u>             |                                     |     |
|          | 301                                                                  |                                     | 350 |
| VPH-16   | EPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRRAGAVGENVPDDLYIKSGSGSTANLASS                  |                                     |     |
| VPH-18   | DPYGDSMFFCLRREQLFARHFWRNRRAGTMDTVPSLYIKGTGMRASPGSC                   |                                     |     |
| VPH-31   | EPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRRAGAVGENVPDDLYIKSGSGSTANLASS                  |                                     |     |
| Consenso | <u>EPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRRAGAVGENVPDDLYIKSGSGSTANLASS</u>           |                                     |     |
|          | 351                                                                  |                                     | 400 |
| VPH-16   | NYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTTS                   |                                     |     |
| VPH-18   | VYSPSPSGSIVTSDSQLFNKPYWLHKAQGHNNGVCWHNQLFVTVVDTTTS                   |                                     |     |
| VPH-31   | NYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTTS                   |                                     |     |
| Consenso | <u>NYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTTS</u>            |                                     |     |
|          | 401                                                                  |                                     | 450 |
| VPH-16   | TNMSLCAAISTSET-TYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVM                   |                                     |     |
| VPH-18   | TNLTICASTQSPVPGQYDATKFKQYSRHVEEYDLQFIFQLCTITLTADVM                   |                                     |     |
| VPH-31   | TNMSLCAAISTSEP-TYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVM                   |                                     |     |
| Consenso | <u>TNMSLCAAISTSEP</u> <u>TYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVM</u>     |                                     |     |
|          | 451                                                                  |                                     | 500 |

|          |                                                           |                    |                 |          |
|----------|-----------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|----------|
| VPH-16   | TYIHSMNSTILEDWNFG                                         | QPPPGGTTLED        | TYRFVTSQAIACQKH | TPPAPKE  |
| VPH-18   | SYIHSMNSSILEDWNFG                                         | VPPPTTSLVD         | TYRFVQSVAITCQK  | DAAPAENK |
| VPH-31   | SYIHSMNSTILEDWNFG                                         | QPPPGGTTLED        | TYRFVTSQAIACQKH | TPPAPKE  |
| Consenso | <b><u>SYIHSMNSTILEDWNFGQPPPGGTTLEDTYRFVTSQAIACQKH</u></b> |                    |                 |          |
|          | 501                                                       |                    |                 | 550      |
| VPH-16   | DPLKKYTFWEVNLKEKFS                                        | ADLDQFPLGRKFLLQAGL | KAKPKFTL        | GKRKAT   |
| VPH-18   | DPYDKLKFWNVDLKEKFS                                        | LDLDQYPLGRKFLVQAGL | RRKPTIGPRKR     | -SA      |
| VPH-31   | DPLKKYTFWEVNLKEKFS                                        | ADLDQFPLGRKFLLQAGL | KAKPKFTL        | GKRKAT   |
| Consenso | <b><u>DPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGL</u></b>        |                    |                 |          |
|          | 551                                                       |                    | 570             |          |
| VPH-16   | PTTSSTSTTAKRKKRKL                                         | ---                |                 |          |
| VPH-18   | PSATTSSKPAKRVRVRAR                                        | K-                 |                 |          |
| VPH-31   | PTTSSTSTTAKRKKRKL                                         | ---                |                 |          |
| Consenso | <b><u>PTTSSTSTTAKRKKRKL</u></b>                           |                    |                 |          |

**Fig.3.** En alineamiento de secuencias de la proteína L1 de los VPH-16, VPH-18 y VPH-31, determinados con la ayuda del programa bioinformático NTI vector,<sup>19,20,21</sup> se muestra el grado de homología existente entre las proteínas L1 de diferentes tipos virales.

Se han reportado epítomos lineales y conformacionales sobre la superficie de las PSV del VPH,<sup>22</sup> lo que ha permitido establecer que estos epítomos son los responsables de la actividad neutralizante de los anticuerpos.<sup>23</sup>

El uso de PSV recombinantes como inmunógenos se ha incrementado en los años recientes.<sup>14</sup> La mayoría de las vacunas contra las enfermedades virales, tradicionalmente se ha basado en cepas de virus atenuados, o en la inactivación de virus infecciosos. El autoensamblaje de la proteína recombinante de la cápsida viral y los correspondientes capsómeros en cápsidas vacías, constituye una prometedora estrategia para la producción y diseño de vacunas basadas en PSVs. Las vacunas actuales contra el VPH basadas en la formación de dichas estructuras (Gardasil y Cervarix) han demostrado su éxito en la prevención de las infecciones provocadas por el VPH.<sup>24-29</sup>

Cuando la proteína L1 es expresada en células de insecto o levadura, esta puede autoensamblarse en PSV. La estabilidad de dicha estructura puede ser mejorada mediante la maduración oxidativa<sup>30,31</sup> o el reensamblaje.<sup>32,33</sup>

La organización espontánea de los capsómeros L1 pentaméricos, ensamblados periódicamente en PSV cuasi-simétricas dentro de las células de levadura, es controlada por la coacción termodinámica mediante la combinación de varias fuerzas intra e intercapsoméricas. Sin embargo, debido a la heterogeneidad del polimorfismo del ensamblado ello es común para las PSV que carecen de material genético,<sup>34,35</sup> además, del cierto grado de agregación y formación de cápsidas incompletas durante la expresión en células de levadura y en los posteriores procesos de purificación.<sup>33</sup>

### TECNOLOGÍAS EMPLEADAS PARA LA EXPRESIÓN DE PSV DEL VPH

Los métodos *in vivo* de producción de PSV, implican la síntesis, el plegamiento ordenado y la asociación cuaternaria de las proteínas que forman la cápsida dentro de las células en un medio ambiente favorable. En el interior de estas células, se produce el ensamblaje macromolecular, ya sea mediante la autoasociación espontánea en el citoplasma, o en las interfases tales como las membranas celulares o sobre proteínas clave que actúan como un andamio. Alternativamente el autoensamblaje ocurre en compartimentos celulares que podrían facilitar el ensamblaje mediante el incremento de la proximidad entre los monómeros dentro de un medioambiente químico modificado; por ejemplo, en el núcleo donde existe un medioambiente iónico alterado.<sup>36</sup>

Aunque las modificaciones post traduccionales (glicosilación y fosforilación) frecuentemente son aplicadas en los sistemas de expresión de levaduras e insectos, estas son irregulares, incompletas, y en el caso de la O-glicosilación en levadura potencialmente inmunogénica.<sup>37-39</sup>

Uno de los retos actuales en el desarrollo de vacunas es la necesidad del empleo de métodos rentables para la producción a gran escala de antígenos proteicos.<sup>40</sup> Para obtener elevados niveles de expresión de antígenos L1 del VPH, se han optimizado los codones de las secuencias nucleotídicas que codifican dicho antígeno para su expresión en la célula hospedera.<sup>41</sup> Sin la optimización de los codones, los errores traduccionales introducidos por ARNt aminoacetilados anómalos u otro tipo de codones afectados, la producción y la fidelidad de la traducción puede verse comprometida.<sup>42, 43</sup> Se ha reportado que la optimización del codón del gen L1 del VPH-11 en células epiteliales de mamíferos, incrementa la expresión del gen y la formación de PSV.<sup>44</sup> En levaduras, la compañía Merck ha patentado una serie de codones optimizados para la expresión de proteínas L1 de los VPH-31,<sup>45</sup> VPH-45,<sup>46</sup> VPH-52<sup>47</sup> y VPH-58.<sup>48</sup> Finalmente, en plantas transgénicas de tabaco, los niveles de producción de la proteína L1 del VPH-16 han sido mejorados mediante la optimización del gen L1 vinculado a una señal clave de los cloroplastos.<sup>49</sup>

### SISTEMAS DE EXPRESIÓN EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PSV DEL VPH

Las vacunas actuales contra el VPH, son producidas en los sistemas de expresión constituido por *Saccharomyces cerevisiae* (Gardasil<sup>®</sup>) y las células de insectos infectadas con el baculovirus *Tricoplusia ni* (Cervarix<sup>®</sup>). En las primeras fases del desarrollo de tecnologías basadas en PSV del VPH, varios laboratorios trabajaron en la expresión de la proteína L1 en *E. coli*. Chen y cols., demostraron que la proteína L1 del VPH-11 y el VPH-16 con el extremo N-terminal modificado, puede ser expresada y purificada en forma de pentámeros nativos (capsómeros).<sup>50</sup> La producción de la proteína L1 en plantas transgénicas ha sido evaluada en numerosos estudios. Se ha reportado que la superficie del antígeno del virus de la hepatitis B, puede ser expresado y ensamblado en plantas transgénicas.<sup>51</sup> En este sentido es importante destacar, que la administración oral del material vegetal sin transformar, indujo la inmunidad específica de HBsAg en ratones y en voluntarios sanos.<sup>52</sup>

Este reporte desencadenó la idea de que los antígenos de una vacuna pueden ser producidos con el empleo de plantas transgénicas. La gran ventaja del uso de plantas es la facilidad con la que se pueden producir vastas cantidades de biomasa con el uso de las tecnologías actuales. Tomado esto como premisa, se inició la producción de la proteína L1 en plantas,<sup>49, 53-55</sup> y posteriormente, se confirmó la inmunogenicidad de esta después de la administración oral y sistémica.<sup>56</sup>

Disímiles son las estrategias encaminadas a la búsqueda de un sistema de expresión adecuado para la expresión de L1, teniendo como principales criterios a evaluar el rendimiento, la inmunogenicidad, la facilidad y bajo costo de las estrategias de purificación; todo ello ha propiciado la evaluación de varios sistemas de expresión como: *Pichia pastoris*,<sup>57-59</sup> *Bacillus subtilis*,<sup>60</sup> *Lactobacillus casei*,<sup>61</sup> *Salmonella enterica* Serovar typhi Ty21a,<sup>62</sup> *Salmonella typhimurium*,<sup>63</sup> *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*.<sup>64</sup> No obstante, los sistemas de expresión basados en las levaduras tienen la ventaja en términos de rentabilidad, disponibilidad para su producción a gran escala, y bajo potencial para la contaminación por toxina y virus, en comparación con los demás sistemas de expresión.<sup>65</sup> (Tabla 1)

**Tabla 1.** Hospederos empleados en la producción de PSV del VPH y otros virus<sup>15</sup>

| Hospedero          | Ejemplos de PSV producidas en el hospedero                                   | Comentario                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bacteria           | -Poliomavirus<br>-Papilomavirus                                              | Sistema simple y eficiente para la producción de proteínas de fagos bacterianos<br>Expresión eficiente de la proteína viral, pero la producción de la proteína soluble puede ser baja<br>Las proteínas de virus que infectan mamíferos normalmente no se ensamblan en PSV<br>No hay modificaciones post-traduccionales de la proteína |
| Levadura           | -Poliomavirus<br>-Papilomavirus<br>- Virus de la hepatitis                   | Productores eficientes y rentables capaces de ensamblar las proteínas estructurales virales en PSVs con una consistente arquitectura                                                                                                                                                                                                  |
| Células de insecto | -Poliomavirus<br>-Papillomavirus<br>-Rotavirus<br>-Calicivirus<br>-Norovirus | Productores de proteínas relativamente eficientes, capaces de ensamblar las proteínas estructurales virales con una mayor consistencia que las levaduras, pero a un elevado costo                                                                                                                                                     |

PSV Partículas similares a virus.

## MÉTODOS EMPLEADOS EN LA PURIFICACIÓN DE PSV DEL VPH

De manera general, los métodos empleados tradicionalmente en la purificación de PSV de los VPH, se han basado en sucesivas ultracentrifugaciones con un gradiente de sacarosa, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico y microfiltración.<sup>57,66,67</sup> Dichos métodos no solo son generalmente muy laboriosos, sino que implican en la mayoría de los casos una baja recuperación de L1, además de la no eliminación de los contaminantes. En la Conferencia Internacional de Papilomavirus N° 26, C B. Buck sugirió que el tratamiento con bajas concentraciones de sulfato de amonio (25 mM) a un pH neutral, incrementa el grado de formación de puentes disulfuro, los cuales son críticos en la estabilidad de la proteína L1.<sup>68</sup>

En un estudio realizado por Park y cols., se compararon tres métodos para la purificación de L1, dos de los cuales son clásicos en la purificación de la proteína en cuestión; en dicho estudio se demostró que independientemente de la optimización de la variable biológica concentración de carbono del medio de cultivo, la precipitación con sulfato de amonio arroja resultados significativos con respecto a los dos métodos de purificación que no la incluyen, en términos de recobrado de L1.<sup>67</sup>

Durante la purificación de PSV recombinantes del VPH, las resinas convencionalmente utilizadas en las estrategias cromatográficas, tienen la capacidad de afectar la estructura y la inmunogenicidad de dicho ensamblado macromolecular. Para ello, se han desarrollado estrategias cromatográficas basadas en la inmunología del VPH.<sup>68</sup>

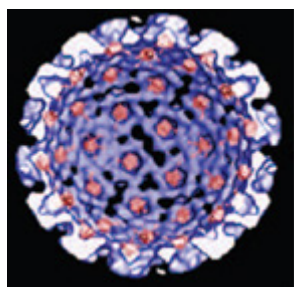
Numerosos virus, incluyendo el VPH, experimentan cambios conformacionales cuando interactúan con los receptores de la superficie de las células que infectan,<sup>69-71</sup> donde estos cambios conformacionales influyen en la selección de los epítomos inmunodominantes sobre la superficie de la cápsida.<sup>71,72</sup> Durante la infección provocada por el VPH, la proteína L1 debe enlazarse primero a los proteoglicanos de heparán sulfato (PGHS), presentes en las membranas basales de las heridas expuestas.<sup>72</sup> La cápsida del VPH realiza un cambio conformacional cuando el virus interactúa con los PGHS, lo que promueve a la exposición de la región N-terminal de la proteína L2, la cual se piensa que interactúa con un receptor secundario.<sup>73</sup>

En un estudio realizado por Selinka y cols., se sugirió que la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-L1 del VPH-31 es diferente antes y después de su unión a la heparina.<sup>69</sup> Por otra parte, Kim y cols., demostraron mediante un estudio comparativo de métodos de purificación, que la unión de la proteína L1 del VPH-16 con algunas resinas puede afectar la inmunogenicidad y el correcto ensamblaje de las PSV del VPH,<sup>68</sup> factor que se debe tener en cuenta en los futuros protocolos de purificación así como en las estrategias a seguir durante la obtención PSV candidatas a futuras vacunas contra el VPH.

## PSV QUIMÉRICAS DEL VPH

En los últimos años, se ha desarrollado una serie de investigaciones enfocadas hacia la producción de PSV quiméricas, con el objetivo de potenciar la respuesta inmune e inducir la protección cruzada entre varios tipos del VPH potencialmente

oncogénicos.<sup>5,74,75</sup> En la actualidad, existen patentes de vacunas quiméricas del VPH, las cuales son clasificadas en dos tipos de tecnologías: las que involucran la fusión de los antígenos del VPH (Fig. 4) y aquellas en la que se fusiona un antígeno del VPH con una molécula inmunoestimuladora.<sup>76</sup>



**Fig.4.** Reconstrucción computarizada en tres dimensiones del interior de una cápsida quimérica (PSV) del VPH. El círculo en blanco en el interior de la figura representa la disposición de la proteína L2 en la PSV.<sup>8</sup>

Se ha reportado que la PSV conformada por la proteína L1 solo induce inmunidad humoral específica contra cada tipo viral. El descubrimiento de varias regiones conservadas de la proteína L2 del VPH,<sup>77</sup> sugiere la idea de que dicha proteína pudiera funcionar como un potencial candidato vacunal contra las infecciones de gran riesgo producidas por los VPHs.

No obstante, se sabe que la inmunidad inducida por la proteína L2 es baja, por lo tanto existe una necesidad de superar este problema mediante el desarrollo de vacunas quiméricas.<sup>53</sup> Por ejemplo, la patente EP1056222 describe un método para la producción de un polipéptido quimérico comprendido por los péptidos de L1 y L2 preferiblemente del VPH-16.<sup>78</sup> Por otra parte, la compañía MediGene AG (Muenchen-Martinsried, Germany) y un grupo de la Universidad de Loyola (Chicago, IL, USA) patentaron vacunas basadas en PSV quiméricas conformadas por la proteína L1 y E7.<sup>79, 80</sup>

## CONCLUSIONES

El desarrollo de estrategias para la producción de PSV se hace necesario en la búsqueda de futuras vacunas contra el VPH, debido a la repercusión mundial de las infecciones provocadas por ellos. Pese al avance actual en las investigaciones encaminadas al desarrollo de las PSVs del VPH, aún existen muchas variables desconocidas que influyen de manera positiva y negativa en el ensamblaje macromolecular de estas estructuras; Por esta razón, las futuras investigaciones deben de estar centradas en su elucidación, con el objetivo de lograr una optimización adecuada de lo que podría ser en un futuro una nueva vacuna profiláctica contra el VPH. Las opciones que brindan las PSV quiméricas del este, constituyen alternativas prometedoras para el desarrollo de vacunas más eficientes en la prevención de las enfermedades provocadas por el virus debido a su composición heterogénea.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fernandes J, Araújo J, Fernandes T. Biology and natural history of human papillomavirus infection. OAJCT. 2013; 5 1-12.
2. Yue Y, Yang H, Wu K, Yang L, Chen J, Huang X, et al. Genetic variability in L1 and L2 genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. PloS one. 2013 ;8(1): e55204.
3. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. Gynecologic oncology. 2010; 117(2 Suppl): S5-10.
4. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. Vaccine. 2012; 31(1): 58-83.
5. Cho HJ, Oh YK, Kim YB. Advances in human papilloma virus vaccines: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents. 2011; 21(3): 295-309.
6. Marlow LA, Zimet GD, McCaffery KJ, Ostini R, Waller J. Knowledge of human papillomavirus (HPV) and HPV vaccination: an international comparison. Vaccine. 2013; 31(5): 763-9.
7. Romanowski B. Long term protection against cervical infection with the human papillomavirus: review of currently available vaccines. Human vaccines. 2011; 7(2): 161-9.
8. Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. Journal of virology. 2008; 82(11): 5190-7.
9. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. Journal of dental research. 2009; 88(4): 307-17.
10. Human papillomavirus type 16 isolate 16W12E. 1999. [Consultado 25 de junio de 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/4927719>
11. Chen Z, DeSalle R, Schiffman M, Herrero R, and Burk RD Human papillomavirus type 18 isolate Qv04924, complete genome. 2009. [Consultado 25 de junio de 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145968262>
12. Brown WL, Mastico RA, Wu M, Heal KG, Adams CJ, Murray JB, et al. RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. Intervirology. 2002; 45(4-6): 371-80.
13. Bachmann AS, Corpuz G, Hareld WP, Wang G, Collier BA. A simple method for the rapid purification of copia virus-like particles from Drosophila Schneider 2 cells. Journal of virological methods. 2004; 115(2): 159-65.
14. Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. Expert review of vaccines. 2010; 9(10): 1149-76.
15. Pattenden LK, Middelberg AP, Niebert M, Lipin DI. Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. Trends in biotechnology. 2005; 23(10): 523-9.

16. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *Journal of virology*. 2004; 78(2): 751-7.
17. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93(4): 284-92.
18. Christensen ND, Kreider JW. Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomaviruses. *Journal of virology*. 1990; 64(7): 3151-6.
19. Patel MC and Mukhopadhyaya R Human papillomavirus type 16 L1 major capsid protein (L1) gene, complete cds. 2005. [Consultado 26 de junio de 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ155283>
20. Shen M, Ding X, Li T, Chen G and Zhou X Human papillomavirus type 18 strain 18-558 L1 protein (L1) gene, complete cds. 2013. [Consultado 26 de junio de 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC456642>
21. Cornut G, Gagnon S, Hankins C, Money D, Franco E and Coutlee F Human papillomavirus type 16 isolate 31 major capsid protein L1 (L1) gene, complete cds. 2009. [Consultado 26 de junio de 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ479006>
22. Christensen ND, Kreider JW, Cladel NM, Galloway DA. Immunological cross-reactivity to laboratory-produced HPV-11 virions of polysera raised against bacterially derived fusion proteins and synthetic peptides of HPV-6b and HPV-16 capsid proteins. *Virology*. 1990; 175(1): 1-9.
23. White WI, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, Woods RM, Ghim SJ, Hewitt LA, et al. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *Journal of virology*. 1999; 73(6): 4882-9.
24. Villa LL. HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer letters*. 2011; 305(2):106-12.
25. Kwak K, Yemelyanova A, Roden RB. Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. *Current opinion in immunology*. 2011; 23(2): 244-51.
26. Majewski S, Bosch FX, Dillner J, Iversen OE, Kjaer SK, Munoz N, et al. The impact of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) virus-like particle vaccine in European women aged 16 to 24. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* : JEADV. 2009;23(10):1147-55.
27. Bryan JT. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine*. 2007; 25(16): 3001-6.
28. Frazer IH, Lowy DR, Schiller JT. Prevention of cancer through immunization: Prospects and challenges for the 21st century. *European journal of immunology*. 2007; 37 Suppl 1:S148-55.
29. Frazer IH, Leggatt GR, Mattarollo SR. Prevention and treatment of papillomavirus-related cancers through immunization. *Annual review of immunology*. 2011;29:111-38.
30. Zhao Q, Wu S, Manger W, Gadam S. Process for making human papillomavirus virus-like particles with improved properties. US Patents 2000/028064, 2002.
31. Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT. Maturation of papillomavirus capsids. *Journal of virology*. 2005;79(5):2839-46.
32. McCarthy MP, White WI, Palmer-Hill F, Koenig S, Suzich JA. Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *Journal of virology*. 1998;72(1):32-41.
33. Mach H, Volkin DB, Troutman RD, Wang B, Luo Z, Jansen KU, et al. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *Journal of pharmaceutical sciences*. 2006;95(10):2195-206.
34. Nguyen HD, Brooks CL, 3rd. Generalized structural polymorphism in self-assembled viral particles. *Nano letters*. 2008; 8(12): 4574-81.
35. Nguyen HD, Reddy VS, Brooks CL, 3rd. Invariant polymorphism in virus capsid assembly. *Journal of the American Chemical Society*. 2009; 131(7): 2606-14.
36. John R, Muller H. Nuclear localization of avian polyomavirus structural protein VP1 is a prerequisite for the formation of virus-like particles. *Journal of virology*. 2004; 78(2): 930-7.
37. Fang NX, Frazer IH, Fernando GJ. Differences in the post-translational modifications of human papillomavirus type 6b major capsid protein expressed from a baculovirus system compared with a vaccinia virus system. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2000; 32 ( Pt 1):27-33.
38. Greene JJ. Host cell compatibility in protein expression. *Methods Mol Biol*. 2004; 267: 3-14.
39. Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramirez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol*. 2004;267:15-52.
40. Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, Garcea RL. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *Journal of virology*. 1997; 71(4): 2988-95.
41. Hatfield GW, Roth DA. Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering. *Biotechnology annual review*. 2007; 13: 27-42.
42. McNulty DE, Claffee BA, Huddleston MJ, Porter ML, Cavnar KM, Kane JF. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2003; 27(2): 365-74.
43. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*. 2005; 115(2): 113-28.
44. Mossadegh N, Gissmann L, Muller M, Zentgraf H, Alonso A, Tomakidi P. Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. *Virology*. 2004; 326(1): 57-66.
45. Jansen KU, Schultz LD, Neeper MP, Markus HZ. Optimized expression of hpv 31 l1 in yeast. Google Patents, 2012.
46. Bryan JT, Brownlow MK, Schultz LD, Jansen KU. Optimized expression of HPV 45 L1 in yeast. Google Patents, 2009.
47. Bryan JT, Brownlow MK, Schultz LD, Jansen KU. Optimized expression of HPV 52 L1 in yeast. Google Patents, 2010.

48. Bryan JT, Brownlow MK, Schultz LD, Wang XM, Jansen KU. Optimized expression of HPV 58 L1 in yeast. Google Patents, 2011.
49. Mac Lean J, Koekemoer M, Olivier AJ, Stewart D, Hitzeroth, II, Rademacher T, et al. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *The Journal of General Virology*. 2007;88(Pt 5):1460-9.
50. Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *Journal of molecular biology*. 2001;307(1):173-82.
51. Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(24):11745-9.
52. Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(8):3358-61.
53. Matic S, Rinaldi R, Masenga V, Noris E. Efficient production of chimeric human papillomavirus 16 L1 protein bearing the M2e influenza epitope in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC biotechnology*. 2011;11:106.
54. Waheed MT, Thones N, Muller M, Hassan SW, Gottschamel J, Lossl E, et al. Plasmid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigen fused with LTB as adjuvant: transplastomic plants show pleiotropic phenotypes. *Plant biotechnology journal*. 2011;9(6):651-60.
55. Lenzi P, Scotti N, Alagna F, Tornesello ML, Pompa A, Vitale A, et al. Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic research*. 2008;17(6):1091-102.
56. Fernandez-San Millan A, Ortigosa SM, Hervas-Stubbs S, Corral-Martinez P, Segui-Simarro JM, Gaetan J, et al. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant biotechnology journal*. 2008;6(5):427-41.
57. Jiang Z, Tong G, Cai B, Xu Y, Lou J. Purification and immunogenicity study of human papillomavirus 58 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*. 2011;80(2):203-10.
58. Hanumantha Rao N, Baji Babu P, Rajendra L, Sriraman R, Pang YY, Schiller JT, et al. Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. *Vaccine*. 2011;29(43):7326-34.
59. Bazan SB, de Alencar Muniz Chaves A, Aires KA, Cianciarullo AM, Garcea RL, Ho PL. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Archives of virology*. 2009;154(10):1609-17.
60. Baek JO, Seo JW, Kwon O, Park SM, Kim CH, Kim IH. Production of human papillomavirus type 33 L1 major capsid protein and virus-like particles from *Bacillus subtilis* to develop a prophylactic vaccine against cervical cancer. *Enzyme and microbial technology*. 2012;50(3):173-80.
61. Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Perez-Martinez G, et al. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(1):745-52.
62. Fraillery D, Baud D, Pang SY, Schiller J, Bobst M, Zosso N, et al. *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007;14(10):1285-95.
63. Nardelli-Haeffliger D, Roden RB, Benyacoub J, Sahli R, Kraehenbuhl JP, Schiller JT, et al. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infection and immunity*. 1997;65(8):3328-36.
64. Kohl TO, Hitzeroth, II, Christensen ND, Rybicki EP. Expression of HPV-11 L1 protein in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *BMC biotechnology*. 2007;7:56.
65. Cook JC, Joyce JG, George HA, Schultz LD, Humi WM, Jansen KU, et al. Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein expression and purification*. 1999;17(3):477-84.
66. Kim SN, Jeong HS, Park SN, Kim HJ. Purification and immunogenicity study of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of virological methods*. 2007;139(1):24-30.
67. Park MA, Kim HJ. Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein expression and purification*. 2008;59(1):175-81.
68. Kim HJ, Lim SJ, Kwag HL. The choice of resin-bound ligand affects the structure and immunogenicity of column-purified human papillomavirus type 16 virus-like particles. *PloS one*. 2012;7(4):e35893.
69. Selinka HC, Giroglou T, Nowak T, Christensen ND, Sapp M. Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *Journal of virology*. 2003;77(24):12961-7.
70. Mirano-Bascos D, Steede NK, Robinson JE, Landry SJ. Influence of disulfide-stabilized structure on the specificity of helper T-cell and antibody responses to HIV envelope glycoprotein gp120. *Journal of virology*. 2010;84(7):3303-11.
71. Dai G, Steede NK, Landry SJ. Allocation of helper T-cell epitope immunodominance according to three-dimensional structure in the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein gp120. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(45):41913-20.
72. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*. 2010;118(1 Suppl):S12-7.
73. Day PM, Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by I2 cross-neutralizing and I1 type-specific antibodies. *Journal of virology*. 2008;82(9):4638-46.
74. Martin Caballero J, Garzon A, Gonzalez-Cintado L, Kowalczyk W, Jimenez Torres I, Calderita G, et al. Chimeric infectious bursal disease virus-like particles as potent vaccines for eradication of established HPV-16 E7-dependent tumors. *PloS one*. 2012;7(12):e52976.
75. Sharma C, Dey B, Wahiduzzaman M, Singh N. Human papillomavirus 16 L1-E7 chimeric virus like particles show prophylactic and therapeutic efficacy in murine model of cervical cancer. *Vaccine*. 2012;30(36):5417-24.

76. Kadish AS, Einstein MH. Vaccine strategies for human papillomavirus-associated cancers. *Current opinion in oncology*. 2005;17(5):456-61.
77. Kawana K, Yasugi T, Taketani Y. Human papillomavirus vaccines: current issues & future. *The Indian journal of medical research*. 2009;130(3):341-7.
78. Rybicki EP, Varsani AD. Chimeric human papillomavirus 16 11 proteins comprising an l2 peptide, virus-like particles prepared therefrom and a method for preparing the particles. US Patent 12,174,104, 2005.
79. Gissmann L, Muller M. Papilloma virus capsomere vaccine formulations and methods of use. US Patent 11,358,285, 2010.
80. Hallek M, Burger A. Papillomavirus truncated L1 protein and fusion protein constructs. US Patent 10,654,129, 2003.