



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 218 629**

51 Int. Cl.:
C07K 14/18 (2006.01)
C12N 15/40 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **97120661 .0**
96 Fecha de presentación : **07.11.1991**
97 Número de publicación de la solicitud: **0842947**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.1998**

54 Título: **Asialoglicoproteínas del virus de la hepatitis C.**

30 Prioridad: **08.11.1990 US 611419**
13.09.1991 US 758880

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.11.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **02.06.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **02.06.2009**

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Ralston, Robert O.;**
Marcus, Frank;
Thudium, Kent B.;
Gervase, Barbara A. y
Hall, John A.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 218 629 T5

DESCRIPCIÓN

Asialoglicoproteínas del virus de la hepatitis C.

5 Esta invención se refiere a los campos generales de expresión de proteínas recombinantes y virología. Más particularmente, la invención se refiere a glicoproteínas útiles en diagnóstico, tratamiento, y profilaxis de la infección con el virus de la hepatitis C (HCV), y procedimientos para producir tales glicoproteínas.

Antecedentes de la invención

10 La hepatitis no A, no B (NANBH) es una enfermedad transmisible (o una familia de enfermedades) que se cree que se induce viralmente, y es distinguible de otras formas de enfermedad hepática asociada a virus, tal como aquella causada por el virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis delta (HDV), citomegalovirus (CMV) o virus Epstein-Barr (EBV). La evidencia epidemiológica sugiere que puede haber tres tipos de
15 NANBH: el tipo epidémico llevado por el agua; el tipo asociado a sangre o agujas; y el tipo adquirido en comunidad que se presenta esporádicamente. El número de agentes causantes es desconocido. Sin embargo, una nueva especie viral, el virus de la hepatitis C (HCV) se ha identificado recientemente como la causa principal (si no la única) de la NANBH llevada por la sangre (BB-NANBH). Véase por ejemplo el documento PCT WO89/046699. La hepatitis
20 C parece ser la forma principal de hepatitis asociada a transfusión en un número de países o regiones, incluyendo los Estados Unidos, Europa, y Japón. También hay evidencias que implica al HCV en la inducción del carcinoma hepatocelular. Así, existe una necesidad de un procedimiento efectivo para prevenir y tratar infección con HCV.

La demanda de procedimientos sensibles, específicos para rastrear e identificar portadores de HCV y sangre contaminada con HCV o productos sanguíneos es significativa. La hepatitis post-transfusión (PTH) se da aproximadamente
25 en el 10% de los pacientes transfundidos, y el HCV da cuenta de más del 90% de estos casos. El problema principal en esta enfermedad es la frecuente progresión hacia daño crónico del hígado (25-55%).

El cuidado del paciente, del mismo modo que la prevención de la transmisión de HCV por sangre o productos sanguíneos o por contacto personal íntimo, requiere diagnóstico fiable y herramientas de pronóstico para detectar
30 ácidos nucleicos, antígenos y anticuerpos relativos a HCV. Además, hay también una necesidad de vacunas efectivas y agentes terapéuticos de inmunoterapia para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad.

El HCV aparece en la sangre de los individuos infectados a tasas muy bajas en relación a otros virus infecciosos, los cuales hacen al virus muy difícil de detectar. La carga viral baja es probablemente la razón principal de que el
35 agente causante de la hepatitis NANB pase tanto tiempo sin detectar. Incluso aunque ahora se haya clonado, el HCV aún resulta difícil de cultivar y propagar. Por consiguiente, hay una fuerte necesidad de medios recombinantes de producción de proteínas diagnósticas/terapéuticas/profilácticas de HCV.

El documento EP0450931A, que forma parte del estado de la técnica solamente en virtud del Artículo 54 (3) EPC para los estados designados comúnmente y es por lo tanto relevante para la consideración novedosa solamente, se refiere al campo de inmunoensayos, más particularmente se refiere al campo de inmunoensayos, más particularmente se refiere a combinaciones de antígenos de HCV que permiten un amplio intervalo de inmunoensayos para anticuerpos anti-HCV. El ejemplo 3 del documento EP0450931A describe un antígeno de HCV, S2, que consta de los aminoácidos
40 192 - 328 del genoma de HCV obtenido mediante la expresión en levaduras. Sin perjuicio, esta material sujeto se ha excluido del ámbito de la reivindicación 1 en virtud de una limitación de responsabilidad de acuerdo con las decisiones G1/03 y G2/03 del Consejo de Administración Ampliado de Apelación de la EPO.

Adicionalmente, hay una gran necesidad de una vacuna HCV. Es, sin embargo, extremadamente difícil cultivar HCV en líneas celulares. Así, no ha sido posible producir cepas atenuadas de virus mediante el paso en serie en
50 cultivo celular/tisular.

Descripción de la invención

Se ha encontrado que dos proteínas de HCV, E1 y E2, parecen ser asialoglicoproteínas asociadas a membrana cuando se expresan en sistemas recombinantes. Esto es sorprendente porque las glicoproteínas no permanecen usualmente
55 en una forma terminada en manosa en mamíferos, sino que son modificadas adicionalmente con otros carbohidratos: la forma terminada en manosa es típicamente sólo transitoria. En el caso de E1 y E2 (como se expresan en nuestros sistemas), la asialoglicoproteína parece ser la forma final. E1 (proteína de la envoltura) es una glicoproteína que tiene un peso molecular de 35 kD la cual se traduce a partir de la región predicha E1 del genoma de HCV. E2 (proteína de
60 la envoltura 2) es una glicoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 72 kD la cual se traduce de la región predicha NS1 (proteína no estructural 1) del genoma de HCV, basada en el modelo flavoviral de HCV. Como las glicoproteínas virales son a menudo altamente inmunogénicas, E1 y E2 son candidatos principales para usar en inmunoensayos y vacunas terapéuticas/profilácticas.

El descubrimiento de que E1 y E2 no estén sialiladas es significativo. La forma particular de una proteína a menudo dicta cuales células pueden servir como huésped adecuados para la expresión recombinante. Los procariontes tales como *E. coli* no glicosilan las proteínas, y son generalmente no adecuados para la producción de glicoproteínas para usar como antígenos porque la glicosilación es a menudo importante para la antigenicidad, solubilidad y estabilidad plenas
65

de la proteína. Los eucariotas inferiores tales como levaduras y hongos glicosilan las proteínas, pero son generalmente incapaces de añadir restos terminales de ácido siálico a los complejos carbohidrato. Así, las proteínas derivadas de levadura pueden ser antigénicamente distintas de sus homólogas naturales (no recombinantes). La expresión en células de mamíferos se prefiere para aplicaciones en las cuales la antigenicidad del producto es importante, como la glicosilación de la proteína recombinante se parecería mucho a la de las proteínas virales silvestres.

Nuevas evidencias indican que el virus HCV puede conseguir entrar en las células huésped durante la infección bien a través del receptor de asialoglicoproteínas encontrado en hepatocitos, o bien a través del receptor de manosa encontrado en células endoteliales hepáticas y macrófagos (particularmente células de Kupffer). Sorprendentemente, se ha encontrado que la mayoría de las E1 y E2 naturales no contiene restos de ácido siálico terminales, sino que están sólo glicosiladas en el núcleo. Una pequeña fracción contiene adicionalmente N-acetilglucosamina terminal. Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar glicoproteínas de la cubierta que carezcan todas o sustancialmente todas de restos terminales de ácido siálico.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para producir asialo- E1 o E2, bajo condiciones que inhiben la adición de ácido siálico terminal, por ejemplo, mediante expresión en levadura o mediante expresión en células de mamíferos usando antibióticos para facilitar secreción o liberación.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para purificar E1 o E2 por afinidad a lectinas las cuales unen restos de manosa o restos de N-acetilglucosamina terminales.

Otro aspecto de la invención es una composición inmunógena que comprende una asialoglicoproteína recombinante seleccionada del grupo que consta de HCV E1 y E2 en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable. Alguien puede incluir opcionalmente un coadyuvante inmunológico, si se desea.

Otro aspecto de la invención es un reactivo de inmunoensayo, comprendiendo una asialoglicoproteína recombinante seleccionada del grupo que consta de HCV E1 y E2 en combinación con un soporte aceptable. Otro reactivo de inmunoensayo de la invención comprende una asialoglicoproteína recombinante seleccionada del grupo que consta de HCV E1 y E2 en combinación con una señal adecuada detectable.

Otro aspecto de la invención concierne a los dímeros y agregados de orden superior de E1 y/o E2. Una especie química de la invención es un complejo E2. Otra especie química de la invención es un heterodímero E1:E2.

Otro aspecto de la invención es una composición de vacuna HCV comprendiendo agregados E1:E2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para purificar los complejos E1:E2.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para propagar HCV en cultivo celular, que comprende (a) proporcionar una célula que exprese un receptor seleccionado del grupo que consta del receptor de manosa y el receptor de asialoglicoproteína; (b) infectar la célula con HCV; y (c) cultivar la célula infectada. Preferiblemente, la célula expresa un receptor recombinante.

Modos de llevar a cabo la invención

A. Definiciones

El término "asialoglicoproteína" se refiere a una proteína glicosilada la cual está sustancialmente libre de restos de ácido siálico. Las asialoglicoproteínas se pueden preparar recombinantemente, o mediante purificación a partir de un cultivo celular o fuentes naturales. Actualmente las asialoglicoproteínas preferidas se derivan de HCV, preferiblemente las glicoproteínas E1 y E2, lo más preferiblemente E1 y E2 recombinantes (rE1 y rE2). Una proteína está "sustancialmente libre" de ácido siálico dentro del ámbito de esta definición si la cantidad de restos de ácido siálico no interfieren sustancialmente con la unión de la glicoproteína a las proteínas de unión a manosa tales como GNA. Este grado de sialización se obtendrá generalmente donde menos de aproximadamente el 40% del carbohidrato total unido al extremo N-terminal es ácido siálico, más preferiblemente menos de aproximadamente el 30%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%.

El término "E1" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína o polipéptido expresado dentro de los primeros 400 aminoácidos de una poliproteína HCV, referida algunas veces como la proteína E o S. En su forma natural es una glicoproteína de 35 kD la cual se halla fuertemente asociada a membrana. En la mayoría de las cepas naturales de HCV, la proteína E1 está codificada en la poliproteína viral siguiendo a la proteína C (del núcleo). La proteína E1 se extiende desde aproximadamente el aminoácido 192 hasta aproximadamente el aminoácido 383 de la poliproteína en su longitud total. El término "E1" como se usa en el presente documento incluye también análogos y mutantes truncados los cuales presentan reacciones inmunológicas cruzadas con la E1 natural.

El término "E2" como se usa en el presente documento incluye se refiere a una proteína o polipéptido expresado dentro de los primeros 900 aminoácidos de una poliproteína HCV, referidos algunas veces como la proteína NS1. En

ES 2 218 629 T5

su forma natural es una glicoproteína la cual se encuentra fuertemente asociada a membrana. En la mayoría de las cepas naturales de HCV, la proteína E1 sigue a la proteína E1. La proteína E2 se extiende desde aproximadamente al aminoácido 384 hasta aproximadamente el aminoácido 820. El término “E2” como se usa aquí incluye también análogos y mutantes truncados, los cuales presentan reacciones inmunológicas cruzadas con la E2 natural.

El término “agregado” como se usa en el presente documento se refiere a un complejo de E1 y/o E2 que contiene más de un monómero de E1 o E2. Dímeros E1:E1, dímeros E2:E2, y heterodímeros E1:E2 son todos “agregados” dentro del ámbito de esta definición. Las composiciones de la invención pueden incluir también agregados mayores, y pueden tener también pesos moleculares en exceso de 800 kD.

El término “partícula” como se usa en el presente documento se refiere a E1, E2, o a un agregado E1/E2 visibles por microscopía electrónica y que tienen una dimensión de al menos 20 nm. Las partículas preferidas son aquellas que tienen una apariencia más o menos esférica y un diámetro de aproximadamente 40 nm en microscopía electrónica.

El término “purificado” como se aplica a proteínas en el presente documento se refiere a una composición en la que la proteína deseada comprende al menos el 35% del componente proteico total en la composición. La proteína deseada comprende preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 60%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, y lo más preferible al menos un 95% del componente proteico total. La composición puede contener otros compuestos tales como carbohidratos, sales, lípidos, disolventes y similares, sin afectar a la determinación de porcentaje de pureza como se usa en el presente documento. Una asialoglicoproteína “aislada” de HCV se dice de una composición de asialoglicoproteína la cual está al menos pura al 35%.

“Proteína de unión a manosa” como se usa en el presente documento, se dice de una lectina u otra proteína la cual se une específicamente a las proteínas que tienen glicosilaciones terminadas en manosa (por ejemplo, asialoglicoproteínas), por ejemplo, lectinas de unión a manosa, anticuerpos específicos para glicosilación terminada en manosa, proteína receptora de manosa (R.A.B. Ezekowitz y col., *J. Exp. Med.* (1990) 176: 1785-94), proteínas receptoras de asialoglicoproteína (H. Kurata y col., *J. Biol. Chem.* (1990) 265: 11295-98), proteína de suero de unión a manosa (I. Schuffenecker et al., *Citogenet. Cell Genet.* (1991) 56: 99-102; K. Sastry y col., *J. Immunol* (1991) 147: 692-97), proteína de suero de unión a asialoglicoproteína, y similares. Las lectinas de unión a manosa incluyen, por ejemplo, GNA, Concavalina A (ConA), y otras lectinas con propiedades de unión similares.

El término “GNA lectina” se refiere a la aglutinina de *Galanthus nivalus*, una lectina comercialmente disponible la cual se une a las glicoproteínas terminadas en manosa.

Una glicoproteína “recombinante” como se usa en el presente documento es una glicoproteína que se expresa a partir de un polinucleótido recombinante, en el cual el gen estructural que codifica la glicoproteína se expresa bajo el control de secuencias reguladoras no adyacentes en la naturaleza al gen estructural, o en las cuales el gen estructural se modifica. Por ejemplo, alguien puede formar un vector en el cual el gen estructural E1 está situado bajo el control de un fragmento funcional del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (abreviadamente en inglés GAPDH) de levadura. Un promotor preferido actualmente para usar en levaduras es el promotor híbrido ADH2/GAP descrito en la patente de los Estados Unidos N°. 4.880.734, el cual emplea un fragmento del promotor de la GAPDH en combinación con la activación cadena arriba de secuencia derivada de la alcohol-deshidrogenasa 2. Las modificaciones del gen estructural pueden incluir la sustitución de diferentes codones con codones degenerados (por ejemplo, para utilizar los codones preferidos por el huésped, eliminar o generar sitios de escisión por enzimas de restricción, para controlar la formación de horquillas, etc.), y sustitución, inserción o supresión de un número limitado de codones que codifican diferentes aminoácidos (preferiblemente no más de aproximadamente el 10%, más preferiblemente menos que aproximadamente el 5% en número de la secuencia natural de aminoácidos se alteraría), y similares. De forma similar, un receptor “recombinante” se refiere a una proteína receptora expresada a partir de un polinucleótido recombinante, en el cual el gen estructural que codifica el receptor se expresa bajo el control de las secuencias reguladoras no adyacentes en la naturaleza al gen estructural, o en la cual el gen estructural se modifica.

El término “polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido el cual está sustancialmente libre de otros componentes virales del HCV, particularmente polinucleótidos. Una composición polipeptídica está “sustancialmente libre” de otro componente si el peso del polipéptido en la composición es al menos el 70% del peso del polipéptido y otro componente combinado, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, incluso más preferiblemente aproximadamente el 90%, y lo más preferible el 95% o más. Por ejemplo, una composición que contiene 100 µg/ml de E1 y sólo 3 µg/ml de otro componente del HCV (por ejemplo, DNA, lípidos, etc.) está sustancialmente libre de “otros componentes virales del HCV”, y así es una composición de un polipéptido aislado dentro del ámbito de esta definición.

El término “líder de secreción” se refiere a un polipéptido el cual, cuando está codificado en el extremo N-terminal de una proteína, causa que la proteína se secrete en el medio de cultivo de la célula huésped tras la traducción. El líder de secreción generalmente se derivará de la célula huésped empleada. Por ejemplo, los líderes de secreción adecuados para usar en levaduras, incluyen el factor- α líder de *Saccharomyces cerevisiae* (véase la patente de los Estados Unidos N°. 4.870.008).

El término “eucariota inferior” se refiere a las células huésped tales como levaduras, hongos, y similares. Los eucariotas inferiores son generalmente (pero no necesariamente) unicelulares. Los eucariotas inferiores preferidos

ES 2 218 629 T5

son levaduras, particularmente especies de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, y similares. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* y *K. Lactis* son las levaduras huésped más comúnmente usadas, y son huéspedes fúngicos convenientes.

5 El término “eucariota superior” se refiere a las células huésped derivadas de animales superiores, tales como mamíferos, reptiles, insectos, y similares. Las células huésped eucariotas superiores preferidas actualmente se derivan del hámster chino (por ejemplo, CHO), mono (por ejemplo, células COS), humano, e insecto (por ejemplo, *Spodoptera frugiperda*). Las células huésped pueden proporcionarse en suspensión o cultivos de matraz, cultivos tisulares, cultivos de órganos, y similares.

10 El término “modulador de calcio” se refiere a un compuesto capaz de secuestrar o unir iones de calcio dentro del retículo endoplásmico, o afectar la concentración de ión calcio dentro del ER (abreviatura en inglés de retículo endoplásmico) por su efecto en proteínas reguladoras de calcio (por ejemplo, proteínas canales de calcio, bombas de calcio, etc.). Los moduladores de calcio adecuados incluyen, por ejemplo, tapsigargina, EGTA (ácido etilenglicol-bis- [éter de β -aminoetil]- N,N,N',N'-tetraacético). El modulador actualmente preferido es tapsigargina (véase por ejemplo, O. Thastrup y col., *Ptoc. Nat. Acad. Sci. USA* (1990) 87: 2466-70).

15 El término “inmunogénico” se refiere a la capacidad de una sustancia para causar una respuesta inmune humoral y/o celular, tanto cuando está sola o cuando está unida a un vehículo, en presencia o ausencia de un coadyuvante. “Neutralización” se refiere a una respuesta inmune que bloquea la infectividad, bien parcialmente o bien totalmente, de un agente infeccioso. Una “vacuna” es una composición inmunogénica capaz de facilitar protección contra HCV, tanto parcial como completa, útil para el tratamiento de un individuo.

20 El término “líquido biológico” se refiere a un fluido obtenido de un organismo tal como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucus, y similares. En general, un líquido biológico puede ser rastreado buscando la presencia de partículas de HCV. Algunos fluidos biológicos se usan como una fuente de otros productos, tales como factores de coagulación (por ejemplo, factor VIII:C), seroalbúmina, hormona del crecimiento, y similares. En tales casos, es importante que la fuente de fluido biológico este libre de contaminación por virus tales como HCV.

30 B. Procedimiento general

La región E1 del genoma HCV se describe en EP 388.232 como región “E”, mientras que E2 se describe como “NS1”. La región E1 comprende aproximadamente los aminoácidos 192-383 en la poliproteína viral completa. La región E2 comprende aproximadamente los aminoácidos 384-820. Las secuencias completas de los prototipos de estas proteínas (cepa HCV-1) están disponibles en la técnica (véase el documento EP 388.232), y son procedimientos generales para clonar y expresar las proteínas. Tanto E1 como E2 pueden expresarse a partir de un polinucleótido que codifica los primeros 850-900 aminoácidos de la poliproteína HCV; el procesamiento postraduccional en la mayoría de las células huésped eucariotas escinde la poliproteína inicial en C, E1 y E2. Alguien puede truncar el extremo 5' de la región codificante para reducir la cantidad de proteína C producida.

40 La expresión de asialoglicoproteínas se puede lograr mediante un número de procedimientos. Por ejemplo, alguien puede obtener expresión en eucariotas inferiores (tales como levadura) los cuales normalmente no añaden restos de ácido siálico a proteínas glicosiladas. En los sistemas de expresión en levaduras, actualmente se prefiere emplear una líder de secreción tal como el factor- α líder de *Saccharomyces cerevisiae*, de tal forma que la proteína se expresa en el medio de cultivo tras la traducción. También se prefiere actualmente emplear mutantes deficientes en glicosilación tales como pmrl, como estos mutantes proporcionan sólo glicosilación del núcleo, y a menudo secreta proteínas heterólogas con más alta eficiencia (H.K. Rudolph y col., *Cell* (1989), 58: 133-45). Como alternativa, se puede emplear otras especies de levaduras, tales como *Pichia pastoris*, la cual expresa glicoproteínas que contienen 8-9 restos de manosa en un patrón que se cree que se parece al patrón de glicosilación del núcleo observado en mamíferos y *S. cerevisiae*.

50 Como alternativa, alguien puede organizar la expresión en células de mamíferos, y bloquear la glicosilación terminal (adición de ácido siálico). Las construcciones recombinantes incluirán preferiblemente una señal de secreción para asegurar que la proteína se dirija hacia el retículo endoplásmico. El transporte al golgi parece estar bloqueado por E1 y E2 por sí mismos: el alto nivel de expresión de E1 o E2 en las células de mamífero parece detener la expresión de todas las proteínas celulares en el retículo endoplásmico o en el golgi *cis*. Alguien puede emplear adicionalmente un mutante defectivo en glicosilación. Véase, por ejemplo, P.Stanley, *Ann. Rev. Genet* (1984) 18: 525- 52. En el evento un mutante en glicosilación o transporte expresa E1 o E2 con sialización, los restos de ácido siálico terminal se pueden eliminar mediante tratamiento con neuraminidasa.

60 La producción se incrementaría adicionalmente mediante el uso de un modulador de calcio para obtener la liberación de la proteína de dentro del retículo endoplásmico. Los moduladores adecuados incluyen tapsigargina, EGTA, y A23817 (véase, por ejemplo, O. Thastrup y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1990) 87: 2466-70). Por ejemplo, se puede expresar una gran cantidad de E1 y E2 intracelularmente en células de mamífero (por ejemplo, CHO, COS, células HeLa, y similares) mediante la transfección con un virus vaccinia recombinante. Después de dejar pasar tiempo para la expresión y acumulación de la proteína en el retículo endoplásmico, las células se exponen a un modulador de calcio en una gran concentración suficiente para causar la liberación de los contenidos del ER. La proteína se recupera entonces del medio de cultivo, el cual se reemplaza para el ciclo siguiente.

Adicionalmente, puede ser ventajoso expresar una forma truncada de la proteína de cubierta. Tanto E1 como E2 parecen tener un dominio altamente hidrófobo, el cual aparentemente ancla la proteína dentro del retículo endoplásmico e impide la liberación eficaz. Así, alguien puede desear eliminar las partes de la secuencia halladas en una o más de las regiones de los aminoácidos 170-190, 260-290 o 330-380 de E1 (contados desde el inicio de la poliproteína), y de los aminoácidos 660-830 de E2 (véase por ejemplo la figura 20-1 del documento EP 388.232). Es probable que al menos uno de estos dominios hidrófobos forme una región transmembrana la cual no es esencial para la antigenicidad de la proteína, y la cual puede así eliminarse sin efecto perjudicial. La mejor región para eliminar se puede determinar dirigiendo un pequeño número de experimentos de supresión dentro de la capacidad del practicante de este campo normal). La supresión del extremo 3' hidrófobo de E2 da como resultado la secreción de una parte de la E2 expresada, con sialización de la proteína segregada.

Se puede usar una variedad de vectores para obtener expresión. Los eucariotas inferiores tales como levaduras se transforman típicamente con plásmidos usando el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio, o se transfectan con un virus recombinante. Los vectores pueden replicarse dentro de la célula huésped de forma independiente, o pueden integrarse dentro del genoma de la célula huésped. Los eucariotas superiores se pueden transformar con plásmidos, pero se infectan típicamente con un virus recombinante, por ejemplo con un virus vaccinia recombinante. Vaccinia es particularmente preferido, dado que la infección con vaccinia detiene la expresión de las proteínas de la célula huésped. Las células huésped preferidas actualmente incluyen líneas celulares HeLa y plasmacitoma). En el presente sistema, esto significa que E1 y E2 se acumulan como las especies glicosiladas principales en el ER del huésped. Como el rE1 y el rE2 serán las glicoproteínas predominantes que están terminadas en manosa, se pueden purificar fácilmente a partir de las células usando lectinas tales como la aglutinina de *Galanthus nivalus* (GNA), la cual une restos terminales de manosa.

Las proteínas que se expresan en la naturaleza como glicoproteínas acabadas en manosa son relativamente raras en la fisiología de los mamíferos. En la mayoría de los casos, una glicoproteína de mamífero está terminada en manosa sólo como un intermediario de transición en la ruta de glicosilación. El hecho de que las proteínas de la cubierta de HCV, expresadas recombinantemente, contienen glicosilación terminada en manosa o (en un menor grado) en N-acetilglucosamina, significa que las proteínas de HCV y los viriones completos se pueden separar y purificar parcialmente de las proteínas endógenas usando lectinas específicas para la manosa terminal o la N-acetilglucosamina. Las proteínas recombinantes parecen auténticas, y se cree que son esencialmente idénticas a las proteínas de la cubierta que se encuentran en el virión maduro libre, o a una forma de proteína de la cubierta asociada a células. Así, alguien puede emplear lectinas tales como GNA para las proteínas acabadas en manosa, y WGA (abreviatura en inglés de aglutinina del germen de trigo) y sus equivalentes para proteínas terminadas en N-acetilglucosamina. Alguien puede emplear lectinas unidas a una fase sólida (por ejemplo, una columna de lectina-Sepharosa®) para separar E1 y E2 de los sobrenadantes del medio de cultivo celular y otros fluidos, por ejemplo, para la purificación durante la producción de antígenos para usar en vacuna o inmunoensayo.

Como alternativa, se puede proporcionar una lectina adecuada para aislar E1, E2, o viriones de HCV de las muestras de fluidos o tejidos a partir de sujetos sospechosos de infección con HCV. Como las proteínas terminadas en manosa son relativamente raras, un procedimiento tal serviría para purificar las proteínas presentes en una muestra, reduciendo sustancialmente el fondo. Tras la unión a lectina, la proteína HCV se puede detectar usando anticuerpos anti-HCV. Si están presentes viriones completos, alguien puede detectar alternativamente los ácidos nucleicos de HCV usando técnicas de PCR u otros procedimientos de amplificación de los ácidos nucleicos dirigidos hacia las regiones conservadas del genoma de HCV (por ejemplo, la región 5' no codificante). Este procedimiento permite el aislamiento y la caracterización de diferentes cepas de HCV sin tener en cuenta el movimiento o variación de los antígenos, por ejemplo en los casos donde una nueva cepa no presenta reactividad cruzada inmunológica con la cepa usada para preparar anticuerpos. Hay muchas otras formas de tomar ventaja del reconocimiento único de las glicoproteínas terminadas en manosa mediante lectinas particulares. Por ejemplo, alguien puede incubar muestras sospechosas de contener viriones de HCV o proteínas con biotina o con lectinas marcadas con avidina, y precipitar el complejo proteína-lectina usando avidina o biotina. Alguien puede usar también la afinidad de la lectina para las proteínas HCV para dirigir compuestos hacia viriones para uso terapéutico, por ejemplo conjugando un compuesto antiviral a GNA. Alternativamente, alguien puede usar lectinas adecuadas para eliminar las glicoproteínas terminadas en manosa de las fracciones de suero o plasma, reduciendo o eliminando así el riesgo de la contaminación por HCV.

Actualmente se prefiere aislar las asialoglicoproteínas E1 y/o E2 a partir de los lisados celulares en bruto mediante incubación con una proteína inmovilizada de unión a manosa, particularmente una lectina tal como ConA o GNA. Las células se lisan, por ejemplo, mediante disrupción mecánica en un tampón hipotónico seguida por centrifugación para preparar un lisado post-nuclear, y centrifugado adicionalmente para obtener una fracción de membrana microsomal en bruto. La fracción de membrana en bruto se solubilizó subsiguientemente en un tampón que contiene un detergente, tal como Tritón X-100, NP-40, o similares. Este extracto subsiguiente se aclaró adicionalmente de particulados insolubles mediante centrifugación, y el lisado clarificado resultante incubado en una columna de cromatografía comprende una proteína de unión a manosa inmovilizada, preferiblemente GNA unido a un soporte sólido tal como agarosa o Sefarosa® durante un periodo de tiempo suficiente para la unión, típicamente de 16 a 20 horas. La suspensión se aplicó entonces a la columna hasta que E1/E2 comenzó a aparecer en el eluyente, se incubó entonces en la columna durante un periodo de tiempo suficiente para la unión, típicamente aproximadamente 12-24 horas. El material unido se lava después con un tampón adicional que contiene detergente (por ejemplo, Tritón X-100, NP40, o similares), y se eluye con manosa para proporcionar asialoglicoproteína modificada. En la elución, es preferible eluir sólo hasta que la proteína empieza a aparecer en el eluido, punto en el cual la elución se detiene y se permite equilibrarse a la

columna durante 2-3 horas antes de seguir adelante con la elución de la proteína. Se cree que esto deja pasar tiempo suficiente para el lento ritmo de salida esperado de los grandes agregados de proteína. En los casos en que E1 y E2 se expresan conjuntamente en forma nativa (es decir, sin truncado del dominio de unión a membrana), una fracción sustancial de las asialoglicoproteínas aparece como agregados E1:E2. Cuando se examinan al microscopio electrónico, una parte significativa de esos agregados aparece en forma de partículas aproximadamente esféricas que tienen un diámetro de aproximadamente 40 nm, el cual es el tamaño esperado para los virus intactos. Estas partículas parecen ser partículas subvirales autoensambladas. Se espera que estos agregados exhiban una estructura cuaternaria muy similar a la estructura de las auténticas partículas que son viriones de HCV, y así se espera que sirvan como vacunas altamente inmunogénicas.

Los complejos E1/E2 pueden purificarse adicionalmente mediante un gel de cromatografía en un medio básico, por ejemplo Fractogel-DEAE o DEAE-Sefarosa®. Usando el gel de cromatografía Fractogel-DEAE, se pueden obtener complejos E1/E2 de una pureza del 60-80%, aproximadamente, se puede purificar E1 adicionalmente mediante tratamiento con lisina-proteasa, por que E1 tiene 0-1 restos de lisina. El tratamiento del complejo con lisina-proteasa destruye E2, y permite la fácil separación de E1.

La especificidad de tejido del HCV, en combinación con la observación de que las glicoproteínas de la envoltura están acabadas en manosa, sugiere que los virus emplean el receptor de manosa o el receptor de asialoglicoproteína (abreviadamente en inglés ASGR) con el fin de conseguir la entrada dentro de las células huésped. Los receptores de manosa se encuentran en macrófagos y células sinusoidales hepáticas, mientras que el ASGR se encuentra en los hepatocitos parenquimáticos. Así, sería posible cultivar HCV empleando células huésped las cuales expresan uno o ambos de estos receptores. se puede emplear también cultivos celulares primarios los cuales expresan de forma natural el receptor, usando condiciones bajo las cuales se mantiene el receptor, o alguien puede transfectar otra línea celular tal como HeLa, CHO, COS, y similares, con un vector proporcionado para la expresión del receptor. La clonación del receptor de manosa y su transfección y expresión en fibroblastos se ha demostrado por M.E. Taylor y col., *J. Biol. Chem.* (1990) 265: 121561-62. La clonación y secuenciación del ASGR se describió por K. Drickamer y col., *J. Biol. Chem.* (1984) 259: 770-78 y M. Spiess y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 6465-69; la transfección y expresión de ASGR funcional en células HTC de rata se describió por M. McPhaul y P. Berg, *Proc Nat Acad Sci USA* (1986) 83: 8863-67 y M. McPhaul y P. Berg, *Mol Cell Biol* (1987) 7: 1841-4. Así, es posible transfectar uno o ambos receptores en líneas celulares adecuadas, y usar las células resultantes como huéspedes para la propagación de HCV en cultivo. El paso en serie de HCV en tales cultivos daría como resultado el desarrollo de cepas atenuadas adecuadas para usar como vacunas vivas. Se puede bien emplear cultivos celulares que expresa el receptor de forma natural, usando condiciones bajo las cuales se mantiene el receptor, o bien puede transfectar otra línea celular tal como HeLa, CHO, COS, y similares, con un vector proporcionando la expresión del receptor. La clonación del receptor de manosa y su transfección y expresión en fibroblastos se ha demostrado por Taylor y col., *supra*, mientras que la transfección y expresión de ASGR funcional en células HTC de ratas se describió por McPhaul y col., *supra*. Actualmente se prefiere emplear una línea celular inmortalizada transfectada con uno o ambos receptores recombinantes.

Se pueden preparar composiciones inmunogénicas de acuerdo a procedimientos conocidos en la técnica. Las composiciones actuales comprenden una cantidad inmunogénica de un polipéptido, por ejemplo, composiciones de partículas E1, E2, o E1/E2, combinadas usualmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente que comprenda adicionalmente un coadyuvante. Si se desea un "cóctel", se pueden mezclar conjuntamente para una eficacia elevada una combinación de polipéptidos de HCV, tales como, por ejemplo, antígenos E1 más antígenos E2. Se espera que las partículas de agregados E1/E2 similares a virus proporcionen un antígeno vacuna particularmente útil. Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar a animales para inducir producción de anticuerpos, bien para proporcionar una fuente de anticuerpos o para inducir inmunidad protectora en el animal.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquier vehículo que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son macromoléculas típicamente grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoácídicos; y partículas virales inactivas. Tales vehículos son bien conocidos por aquellos de habilidad normal en la técnica.

Los coadyuvantes preferidos para mejorar la efectividad de la composición incluyen, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio (alum), N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP) como se encuentra en la patente de los Estados Unidos N°. 4.606.918, N-acetil-normuramyl-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramyl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), y RIBI, el cual contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trealosa, y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión al 2% de escualeno/Tween®80. Adicionalmente, se pueden usar los coadyuvantes tales como Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA). Adicionalmente, el Coadyuvante Completo de Freund (CFA) y el Coadyuvante Incompleto de Freund (IFA) pueden usarse para aplicaciones no humanas y propósitos de investigación.

Las composiciones inmunogénicas contienen típicamente transportadores farmacéuticamente aceptables, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humidificadores o emulsionantes, sustancias tamponadoras de pH, y similares, pueden incluirse en tales portadores.

ES 2 218 629 T5

Típicamente, las composiciones farmacéuticas se preparan como inyectables, bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones; se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, portadores líquidos previamente a la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para un efecto coadyuvante mejorado.

5 Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva del polipéptido HCV, del mismo modo que cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente en este documento, según se necesiten. "Cantidad inmunológicamente efectiva", significa que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento, como se definió
10 anteriormente en este documento. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica por doctor que aplica el tratamiento, la cepa de HCV infectante, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través
15 de pruebas de rutina.

Los agregados ensamblados por sí mismos E1/E2 pueden servir también como vehículos de vacunas para presentar haptenos heterólogos (que no son de HCV), de la misma manera que el antígeno de superficie de hepatitis B (véase la solicitud de patente europea 174.444). En este uso, los agregados E1/E2 proporcionan un portador inmunogénico
20 capaz de estimular una respuesta inmune a haptenos o antígenos conjugados con el agregado. El antígeno se puede conjugar bien por procedimientos químicos convencionales, o se puede clonar dentro del gen que codifica E1 y/o E2 en una posición correspondiente a una región hidrófila de la proteína.

Las composiciones inmunogénicas se administran convencionalmente por vía parenteral, típicamente por inyección, por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente. Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen administración oral y supositorios. La dosificación del tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. La vacuna puede administrarse conjuntamente con otros agentes
25 inmunorreguladores.

30 C. Ejemplos

Los ejemplos presentados más abajo se proporcionan como una guía adicional para el practicante de habilidad normal en la técnica, y no se construyen como limitantes de la infección de cualquier forma.

35 Ejemplo 1

Clonación y expresión

(A) Los vectores se construyeron a partir de plásmidos que contienen la porción 5' del genoma de HCV, como se describe en los documentos EP 318.216 y EP 388.232. El módulo HCV(S/B) contiene un fragmento de DNA de StuI-BgIII que codifica el extremo 5' de la poliproteína desde la Met₁ hasta la Leu₉₀₆, comenzando en el nucleótido -63 en relación a la Met₁. Esto incluye la proteína núcleo (C), la proteína E1 (referida también como NS1), y una parte 5' de la región NS2. Tras la expresión de la construcción, las proteínas individuales C, E1 y E2 se producen mediante
40 procesamiento proteolítico.

El módulo HCV(S/B) contiene un fragmento de DNA de ApaLI-BgIII que codifica el extremo 5' de la poliproteína desde la Met₁ hasta la Leu₉₀₆, comenzando en el nucleótido -6 en relación a la Met₁. Esto incluye la proteína núcleo (C), la proteína E1 (algunas veces referida también como S), la proteína E2 (referida también como NS1), y una parte 5' de la región NS2a. Tras la expresión de la construcción, las proteínas individuales C, E1 y E2 se producen mediante
50 procesamiento proteolítico.

El módulo C-E1(S/B) (una parte StuI-BamHI) contiene el extremo 5' desde la Met₁ hasta la Ile₃₄₀ (un sitio BamHI en el gen). La expresión de este módulo da como resultado la expresión de C y una E1 algo truncada (E1'). La parte truncada a partir del extremo 3' es una región hidrófoba que se cree que sirve como una señal de translocación.
55

El módulo NS1(B/B) (una porción BamHI-BgIII) contiene una pequeña parte 3' de E1 (a partir de Met₃₆₄), E2 completa, y una parte de NS2a (hasta Leu₉₀₆). En esta construcción, el fragmento E1 sirve como una señal de translocación.

El módulo TPA-NS1 emplea una secuencia líder de tejido humano activador de plasminógeno (abreviadamente tPA) como una señal de translocación en lugar de la parte 3' de E1. El módulo contiene una forma truncada de E2, desde Gly₄₀₆ hasta Glu₆₆₁, en la cual se elimina el extremo 3' hidrófobo.

Cada módulo se insertó dentro del vector pGEM3Z (Promega) con o sin una secuencia 5' no codificante sintética de β-globina para su transcripción y translación usando T7 y expresión *in vitro* de reticulocitos de conejo. Se prepararon vectores recombinantes del virus vaccinia (rVV) insertando los módulos dentro del plásmido pSC11 (obtenido del doctor B. Moss, NIH), seguido todo ello por la recombinación con virus vaccinia, como se describió por Charkrabarty
65 *et al.*, *Mol. Cell Biol.* (1985) 5: 3403-09.

ES 2 218 629 T5

(B) Se construyó un vector de expresión alternativa insertando HCV(A/B) entre los sitios StuI y SpeI de pSC59 (obtenido del doctor B. Moss, NIH), seguido todo ello por la recombinación con virus vaccinia, como se describió por Chakrabarty y col., *Mol. Cell Biol.* (1985) 5: 3403-09.

5 (C) Las células HeLa se recogieron por centrifugación durante 7 minutos a 2.000 rpm a temperatura ambiente en botellas de centrífuga de 500 ml estériles (rotor JA-10). Los sedimentos se resuspendieron a una concentración final de 2×10^7 células/ml en un medio de cultivo adicional (medio Joklik MEM Spinner modificado + 5% de suero de caballo y gentamicina). Las existencias del sonicado en bruto del virus vv/SC59-HCV se añadieron a una multiplicidad de infecciones a 8 pfu (unidades formadoras de colonia)/célula, y la mezcla se agitó a 37°C durante 30 minutos. Las
10 células infectadas se transfirieron después a un matraz bajo agitación que contenía 8 l de medio en agitación y se incubaron durante 3 días a 37°C.

Las células cultivadas se recogieron después por centrifugación, y los sedimentos resuspendidos en tampón (10 mM de Tris-HCl, pH 9,0, 152 ml). Las células se homogeneizaron después usando 40 ml de homogeneizador Dounce
15 (50 golpes), y los núcleos sedimentados por la centrifugación (5 minutos, 1600 rpm, 4°C, rotor JA-20). Los sedimentos nucleares se resuspendieron en tampón Tris (24 ml), se rehomogeneizaron, y se sedimentaron de nuevo, combinándose todos los sobrenadantes.

El lisado combinado se dividió en alícuotas de 10 ml y se sonicaron 3 x 30 minutos en un sonicador cuphorn a media potencia. El lisado sonicado (15 ml) se puso en capas sobre almohadillas de 17 ml de sacarosa (36%) en tubos de centrífuga de SW28, y se centrífugo a 13.500 rpm durante 80 minutos a 4°C para sedimentar el virus. El sedimento de virus se resuspendió en 1 ml de tampón Tris (1 mM de Tris HCl, pH 9,0) y se congeló a -80°C.

Ejemplo 2

25 *Comparación de productos in vitro e in vivo*

(A) E1 y E2 se expresaron ambos *in vitro* e *in vivo* y ³⁵S-Met se etiquetó usando los vectores descritos en el ejemplo 1 anteriormente en este documento. Las células BSC-40 y HeLa se infectaron con los vectores rVV para expresión *in vivo*. Tanto el medio como los lisados celulares se examinaron en busca de proteínas recombinantes. Los productos se inmunoprecipitaron usando suero humano inmunizado frente a HCV, mientras que las proteínas *in vitro* se analizaron directamente. Las proteínas resultantes se analizaron mediante SDS-PAGE.

El sistema de expresión de reticulocitos (pGEM3Z con HCV(S/B) o HCV(A/B)) produjo proteínas C, E1 y E2 que tienen pesos moleculares de aproximadamente 18 kD, 35 kD y 72 kD, respectivamente. Lisados de células BSC-40 y células HeLa transfectadas con rVV que contienen HCV(S/B), HCV(A/B) o C-E1(S/B) exhibieron las mismas proteínas. Debido a que el sistema reticulocito no proporciona un procesamiento eficiente en el Golgi y por lo tanto no proporciona ácido siálico, el hecho de que tanto los productos *in vitro* como los *in vivo* exhibieran movilidades idénticas sugiere que las proteínas no están sializadas *in vivo*. Sólo el vector rVV que contiene TPA-NS1 dio como resultado alguna secreción extracelular de E2, la cual exhibió una movilidad alterada consistente con la sialización.

(B) HCV(S/B) se expresó *in vitro* y se incubó con un panel de lectinas biotiniladas: GNA, SNA, PNA, WGA, y ConA. Después de la incubación, los complejos se recogieron en perlas de avidina-acrílica, se lavaron, se eluyeron con una muestra de tampón Laemmli, y se analizaron mediante SDS-PAGE. El resultado mostró que E1 y E2 se unieron a GNA y ConA, lo cual indica la presencia de manosa. GNA se unió a los grupos terminales de manosa, mientras que ConA se unió a cualquier manosa unida en α . La carencia de unión a SNA, PNA, y WGA indicaron que ninguna de las proteínas contenía ácido siálico, galactosa-N-acetilglucosamina, o N-acetilglucosamina.

(C) Se produjeron E1 y E2 marcadas radiactivamente en células BSC-40 mediante infección con rVV que contenía HCV(S/B) (vv/SC11-HCV), e inmunoprecipitó con suero humano HCV⁺ (abreviatura de HCV positivo). Una mitad del material inmunoprecipitado se trató durante toda una noche con neuraminidasa para eliminar un ácido siálico. Después del tratamiento, las proteínas tratadas y no tratadas se analizaron con SDS-PAGE. No se observó diferencia en la movilidad, lo que indica falta de sialización *in vivo*.

55 (D) Se produjeron E1 y E2 marcadas radiactivamente en células BSC-40 mediante infección con rVV que contenía HCV(A/B) (vv/SC59-HCV), y bien inmunoprecipitó con suero humano HCV⁺, o bien precipitó usando lectina de GNA biotinilada unida a perlas acrílicas, usando vv/SC11 libre de secuencias HCV como control. Los precipitados se analizaron mediante SDS-PAGE. Los datos demostraron que E1 y E2 fueron las especies químicas principales de proteínas terminadas en manosa en células infectadas vv/SC59-HCV. GNA fue igual de eficiente que el antisuero humano en precipitar E1 y E2 del medio de cultivo celular. Se observó un componente de 25 kD, pero pareció ser específico para células infectadas por el virus vaccinia.

Ejemplo 3

65 *Purificación usando lectina*

(A) Las células HeLa S3 se inocularon con una alta titulación del virus purificado vv/SC59-HCV en una multiplicidad de infección de 5 pfu/célula, y la mezcla se agitó a 37°C durante 30 minutos. Las células infectadas se transfirieron

ES 2 218 629 T5

después a un matraz en agitación que contenía 8 l de medio en agitación y se incubó durante 3 días a 37°C. Las células se recolectaron de nuevo por centrifugación y se resuspendieron en tampón hipotónico (20 mM HEPES, 10 mM de NaCl, 1 mM MgCl₂, 120 ml) sobre hielo. Las células se homogeneizaron después mediante homogeneizador Dounce (50 strokes), y los núcleos sedimentados por la centrifugación (5 minutos, 1600 rpm, 4°C, rotor JA-20). Los sedimentos nucleares se combinaron, se resuspendieron en 48 ml de tampón isotónico, se rehomogeneizaron, recentrifugaron, combinaron de nuevo, y congelaron a -80°C.

Los sobrenadantes congelados se descongelaron después, y la fracción de membranas microsomales del lisado post-nuclear se aisló por centrifugación durante 20 minutos en un rotor JA-20 a 13.500 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron mediante aspiración.

Los sedimentos se recogieron en 96 ml de tampón detergente (20 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 0,5% Tritón X-100, pH 7,5) y se homogeneizaron (50 golpes). El producto se aclaró por centrifugación durante 20 minutos a 13.500 rpm, 4°C, y los sobrenadantes recogidos.

Una columna de agarosa GNA (1 cm x 3 cm, 3 mg de perlas GNA/ml, 6 ml de volumen del lecho, Vector Labs, Burlingame, CA) se preequilibró con tampón detergente. La muestra de sobrenadante se aplicó a la columna con recirculación a una tasa de flujo de 1 ml/minuto durante 16-20 horas a 4°C. La columna se lavó entonces con tampón detergente.

Las proteínas purificadas E1/E2 se eluyeron con α -D-manósido (0,9 M en tampón detergente) a una tasa de flujo de 0,5 ml/minuto. La elución se detuvo al aparecer E1/E2 en el eluyente, y se permitió reequilibrarse a la columna durante 2-3 horas. Las fracciones se analizaron por transferencia de Western y tinción con plata. Las fracciones correspondientes a un pico se combinaron e irradiaron con rayos UV para inactivar cualquier virus vaccinia residual.

(B) Se sedimentaron asialoglicoproteínas E1 y E2 purificadas mediante GNA-agarosa a través de gradientes de glicerol 20-60%. Los gradientes se fraccionaron y las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE y la prueba de bandas de western. Las bandas se sometieron a una prueba con GNA para la identificación de E1 y E2. El resultado indica la presencia de un heterodímero E1:E2 el cual sedimenta a la tasa esperada (es decir, una posición característica de una proteína de 110 kD). También son patentes los agregados mayores de las proteínas de cubierta de HCV. Los homodímeros E2:E2 también son patentes. E2 parece estar sobrerrepresentado en las especies mayores con respecto a E1, aunque se detectaron especies específicas E1:E2. Los agregados mayores sedimentaron significativamente más rápido que el marcador tiroglobulina.

(C) E1 y E2 purificadas por GNA-agarosa se sedimentaron a través de gradientes de glicerol 20-60% que contienen 1 mM de EDTA. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE con o sin β -mercaptoetanol (abreviadamente β ME). Se observó poca o ninguna diferencia en la abundancia aparente de E1 y E2 en presencia o ausencia de β ME, lo que indica la ausencia de puentes disulfuro entre los heterodímeros.

(D) Los complejos E1/E2 (puros aproximadamente al 40%) se analizaron en un analizador de partículas Coulter DM-4-sub-micron. Se detectó material en el intervalo de 20-60 nanómetros.

(E) Los complejos E1/E2 (puros aproximadamente al 40%) se analizaron mediante microscopía electrónica usando tinción negativa con ácido fosfotúngstico. La micrografía de electrones reveló la presencia de partículas que tienen una apariencia esférica y un diámetro de 40 nm. Los complejos E1/E2 se incubaron con suero humano inmunizado HCV⁺, después se analizaron por EM (abreviatura en inglés de microscopía electrónica) con tinción negativa. Se observaron los complejos de anticuerpo que contienen agregados grandes y partículas menores.

Ejemplo 4

Purificación cromatográfica

(A) El material purificado de lectina preparado y descrito en el ejemplo 3 (0,5-0,8 ml) se diluyó 10x con tampón A (20 mM de tampón Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM de EDTA), y se aplicó a una columna 1,8 x 1,5 cm de Fractogel EMD DEAE-650 (separaciones EM, Gibbstown, Nueva Jersey, n°. cat. 169883) equilibrado en tampón A. La fracción proteica que contiene E1/E2 se eluyó con el mismo tampón a una tasa de flujo de 0,2 ml/minuto, y se recogió 1 ml de fracciones. Las fracciones que contienen E1 y E2 (determinadas por SDS-PAGE) se reservaron y almacenaron a -80°C.

(B) El material purificado en parte anteriormente en este documento (A) tiene una pureza del 60-80%, como se estima por SDS-PAGE. La identificación de las bandas teóricas E1 y E2 se confirmó por análisis de la secuencia N-terminal usando una técnica de transferencia. Para el propósito, el material E1/E2 purificado mediante fractogel-DEAE se redujo mediante adición de tampón Laemmli (pH 6,8, 0,06 M Tris-Cl, SDS al 2,3%, glicerol al 10%, 0,72 M de β -mercaptoetanol) e hirvió durante 3 minutos. La muestra se cargó entonces sobre un gel de poliacrilamida al 10%. Después de SDS-PAGE, la proteína se transfirió a una membrana de 0,2 μ m de difluoruro de polivinilideno (abreviadamente en inglés PVDF) (Laboratorios Bio-Rad Richmond, CA). Las franjas teóricas respectivas de proteína se escinden de la banda y se someten a análisis del aminoácido N-terminal, aunque no se tomó especial cuidado en prevenir el bloqueo aminoterminal durante la preparación del material. Los primeros 15 ciclos revelaron que la muestra E1 tuvo una secuencia Tyr-Gln-Val-Arg-X-Ser-Thr-Gly-X-Tyr-His-Val-X-Asn-Asp, mientras que la secuencia de E2 fue

ES 2 218 629 T5

Thr-His-Val-Thr-Gly-X-X-Ala-Gly-His-X-Val-X-Gly-Phe. Esta secuencia de datos de aminoácidos está de acuerdo con lo que se esperaba a partir de las secuencias de DNA correspondientes.

5 El producto E1/E2 purificado mencionado anteriormente en este documento mediante cromatografía en fractogel-DEAE se cree que es un agregado, como se evidencia por el hecho de que una gran cantidad de E1 y E2 aparecen en el cromatógrafo con los picos fusionados en la región de vacío de volumen de una columna de gel de permeación cromatográfica Bio-Sil TSK-4.000. Esto indica que bajo condiciones nativas una cantidad significativa del complejo E1/E2 tiene un peso molecular de al menos 800 kD. El material E1/E2 que tiene un peso molecular de aproximadamente 650 kD se observó también.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una asialoglicoproteína del virus de la hepatitis C (HCV) seleccionada de una glicoproteína truncada expresada desde la región E1 de HCV la cual comprende una supresión en una parte de la secuencia encontrada en una región que se extiende sobre los aminoácidos 330-380 de la región E1, numerados desde el comienzo de las poliproteínas del HCV y una glicoproteína expresada desde la región E2 de HCV la cual comprende una supresión en una parte de la secuencia que se encuentra en una región que se extiende sobre los aminoácidos 660-830 de la región E2, numerada desde el comienzo de la poliproteína de HCV siempre que la asialoglicoproteína no los aminoácidos 199 a 328 de la proteína E1 de HCV obtenida mediante la expresión en levaduras.

10 2. Una asialoglicoproteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha glicoproteína truncada se expresa desde la región E1 de HCV y comprende una supresión en una parte de la secuencia encontrada en una región que comprende los aminoácidos 330-380 de la región E1, numerada desde el comienzo de la poliproteína de HCV.

15 3. Una asialoglicoproteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha glicoproteína truncada se expresa desde la región E2 de HCV y comprende una supresión en una parte de la secuencia encontrada en una región que comprende los aminoácidos 660-830 de la región E2, numerada desde el comienzo de la poliproteína de HCV.

20 4. Una composición que comprende una asialoglicoproteína de HCV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende una cantidad efectiva de una asialoglicoproteína HCV en un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en un procedimiento de inducir una respuesta inmune en un animal.

30 6. Un procedimiento de inmunoensayo que comprende poner en contacto una muestra biológica con una asialoglicoproteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que dicha asialoglicoproteína lleva una marca detectable.

35

40

45

50

55

60

65