



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 175 657** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 14/00, A 61 K 39/29, G 01 N 33/576, C 12 Q 1/70**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 97115378/13, 07.11.1991
(24) Дата начала действия патента: 07.11.1991
(30) Приоритет: 08.11.1990 US 611.419
(43) Дата публикации заявки: 27.10.1999
(46) Дата публикации: 10.11.2001
(56) Ссылки: EP 0320267 A, 14.06.1989.
(62) Первичная заявка, из которой выделена
настоящая: 93043621 (07.11.1991)
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Большая Спасская 25,
стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский
и Партнеры", Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель:
ЧИРОН КОРПОРЕЙШН (US)
(72) Изобретатель: РЭЛСТОН Роберт О. (US),
МАРКУС Фрэнк (US), ТУДЬЮМ Кент Б.
(US), ГЕРВЭЙС Барбара А. (US), ХОЛЛ Джон
А. (US)
(73) Патентообладатель:
ЧИРОН КОРПОРЕЙШН (US)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) АСИАЛОГЛИКОПРОТЕИН ВИРУСА ГЕПАТИТА С (НСV), ИММУНОГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБ
ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА, СПОСОБ ИММУНОАНАЛИЗА

(57)
Изобретение относится к диагностике,
лечению и профилактике гепатита С. Два
белка оболочки гепатита С (Е1 и Е2)
экспрессируются без сialiлирования.
Рекомбинантная экспрессия этих протеинов в
низших эукариотах или в клетках
млекопитающих, у которых заблокировано
терминальное гликозилирование, дает
рекомбинантные белки, которые имеют

большее сходство с естественными
гликопротеинами вируса гепатита С. Когда их
выделяют при помощи средств к лектину
GNA, протеины Е1 и Е2 соединяются в
вирусоподобные частицы. Клетки, несущие
рецептор маннозы или рецептор
асиалогликопротеина, можно инфицировать
ВГС и использовать для культивирования
вируса. 4 с. и 2 з.п. ф-лы.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 175 657** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 14/00, A 61 K 39/29, G**
01 N 33/576, C 12 Q 1/70

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97115378/13, 07.11.1991
(24) Effective date for property rights: 07.11.1991
(30) Priority: 08.11.1990 US 611.419
(43) Application published: 27.10.1999
(46) Date of publication: 10.11.2001
(62) Earlier application: 93043621 07.11.1991
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja 25,
str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij
i Partnery", Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:
ChIRON KORPOREJShN (US)
(72) Inventor: REHLSTON Robert O. (US),
MARKUS Frehnk (US), TUD'JuM Kent B.
(US), GERVEhJS Barbara A. (US), KhOLL
Dzhon A. (US)
(73) Proprietor:
ChIRON KORPOREJShN (US)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) HEPATITIS C VIRUS (HCV) ASIALOGLYCOPROTEIN, IMMUNOGENIC COMPOSITION, METHOD OF INDUCTION OF IMMUNE RESPONSE, METHOD OF IMMUNE ASSAY

(57) Abstract:

FIELD: medicine, virology. SUBSTANCE: invention relates to methods of diagnosis, prophylaxis and treatment of patients with hepatitis C. Two envelope proteins of hepatitis C (E1 and E2) are expressed without sialylation reaction. Recombinant expression of these proteins in lower eucaryotic organisms or in mammalian cells where terminal glycosylation is blocked results to producing recombinant proteins

exhibiting large analogy with natural hepatitis C virus glycoproteins. If their are isolated by method based on their affinity to lectin GNA then proteins E1 and E2 are assembled to virus-like particles. Cells carrying mannose or asialoglycoprotein receptors can be used for infection hepatitis virus C and to use for virus culturing. EFFECT: improved method of induction and immune analysis. 6 cl, 4 ex

Это изобретение относится к общим областям экспрессии рекомбинантного белка и вирусологии. Более конкретно, изобретение относится к гликопротеинам, пригодным для диагностики, лечения и профилактики инфекции вирусом гепатита С и к способам получения таких гликопротеинов.

Прототипы изобретения

Гепатит НИА-НИВ (ГНАНВ) является трансмиссивным заболеванием (или группой заболеваний), по-видимому, вирусной этиологии, отличающимся от других форм поражения печени, связанного с вирусом, таких как вызванные вирусом гепатита А (ВГА), вирусом гепатита В (ВГВ), вирусом гепатита дельта (ВГД), цитомегаловирусом (ЦМВ) или вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). Эпидемиологические данные наводят на мысль, что ГНАНВ может быть трех типов: эпидемического типа, передающегося с водой, типа, передающегося через кровь или с инъекциями, и типа, спорадически появляющегося у населения. Количество вызывающих его возбудителей неизвестно. Однако недавно были выделены новые виды вирусов, вирус гепатита С (ВГС) как основная (если не единственная) причина передающегося через кровь ГНАНВ (ВВ-ГНАНВ). См., например, РСТ WO 89/046699. Гепатит С является главной формой гепатита, связанного с переливанием крови, во многих странах и регионах, включая Соединенные Штаты, Европу и Японию. Имеются также сведения об участии ВГС в возникновении печеночно-клеточного рака. Поэтому существует необходимость в эффективном способе предупреждения и лечения ВГС-инфекции.

Потребность в чувствительных специфичных методиках для скрининга и выявления носителей ВГС и зараженных ВГС крови и препаратов крови значительна. Посттрансфузионный гепатит (ПТТ) встречается приблизительно у 10% больных, получавших переливание крови, и ВГС вызывает до 90% этих случаев. Основная проблема этого заболевания в том, что оно часто вызывает хроническое прогрессирующее поражение печени (25-55%).

Лечение больного, также как предупреждение передачи ВГС с кровью и препаратами крови или при тесном контакте с персоналом, требует доступных диагностических и прогностических средств для обнаружения нуклеиновых кислот, антигенов и антител, связанных с ВГС. К тому же существует также нужда в эффективных вакцинах и иммунотерапевтических лечебных препаратах для предупреждения и/или лечения этого заболевания.

ВГС появляется в крови инфицированных лиц в очень небольших количествах по сравнению с другими инфекционными вирусами, из-за чего этот вирус очень трудно обнаружить. Низкая концентрация вируса, возможно, является основной причиной того, что возбудитель ГНАНВ так долго оставался необнаруженным. Даже при том, что в настоящее время его клонировали, ВГС все еще трудно культивировать и размножать. Соответственно, очень нужны рекомбинантные способы получения диагностических (терапевтических) профилактических белков ВГС.

Вдобавок, очень нужна вакцина ВГС.

Однако вырастить ВГС в культуре клеток очень трудно. Поэтому не было возможности вывести ослабленные штаммы вируса при помощи серийных пассажей на культурах ткани/клеток.

Сущность изобретения

При экспрессировании в рекомбинантных системах было обнаружено, что два белка ВГС, Е1 и Е2 проявляются как связанные с оболочкой асиалогликопротеины. Это было неожиданным, потому что гликопротеины обычно не остаются у млекопитающих в форме с маннозой на конце, а подвергаются дальнейшим модификациям другими углеводами: форма, оканчивающаяся на маннозу, в типичных случаях, является только переходной. У Е1 и Е2 (как они экспрессировались в наших системах) этот асиалогликопротеин, казалось, являлся конечной формой. Е1 (белок оболочки 1) является гликопротеином с молекулярной массой около 35 кД, который транслируется с предсказанной области Е1 генома ВГС. Е2 (белок оболочки 2) является гликопротеином с молекулярной массой около 72 кД, который транслируется с предсказанной областью NS1 (неструктурный белок 1) генома ВГС, основываясь на флавовирусной модели ВГС. Так как вирусные гликопротеины часто высоко иммуногенны, Е1 и Е2 являются первыми кандидатами для использования в иммуноанализах и терапевтических/профилактических вакцинах.

Открытие, что Е1 и Е2 не сиилированы, является значительным. Особая форма белка часто подсказывает, какие клетки могут служить подходящим хозяином для рекомбинантной экспрессии. Прокариоты, такие как *E.coli*, не гликозилируют белки и, в общем, не подходят для получения гликопротеинов, используемых как антигены, из-за того, что гликозилирование часто является важным для полной антигенности, растворимости и стабильности белка. Низшие эукариоты, такие как дрожжи и грибки, гликозилируют белки, но в целом не способны добавлять к углеводным комплексам терминальные остатки сиаловой кислоты.

Поэтому белки, полученные в дрожжах, могут быть антигенно отличными от своих естественных (нерекомбинантных) аналогов.

Экспрессия в клетках млекопитающих предпочтительна в случаях, когда важна антигенность продукта, так как гликозилирование рекомбинантного протеина должно очень походить на таковое у протеинов природных вирусов.

Новые данные указывают, что при инфицировании вирус ВГС может проникнуть в клетки хозяина либо через асиалогликопротеиновый рецептор, найденный на гепатоцитах, либо через рецептор маннозы, найденный на эндотелиальных клетках печени и макрофагах (особенно, на купферовских клетках). Неожиданно было обнаружено, что масса естественных Е1 и Е2 не содержит терминальных остатков сиаловой кислоты, а только гликозилированную сердцевину. Небольшие фракции дополнительно содержат терминальный N-ацетилглюкозамин. Соответственно, объектом настоящего изобретения является получение гликопротеинов оболочки ВГС, лишенных всех или почти всех терминальных остатков

сиаловой кислоты.

Другим аспектом изобретения является способ получения асиало-Е1 или Е2 в условиях подавления присоединения терминальной сиаловой кислоты, например, путем экспрессии в дрожжах или экспрессии в клетках млекопитающих, используя антибиотики для облегчения секреции или выделения.

Другим аспектом изобретения является способ очистки Е1 и Е2 путем сродства к лектинам, которые связывают терминальные остатки маннозы или терминальные N - ацетилглюкозаминовые остатки.

Другим аспектом изобретения является иммуногенная композиция, включающая рекомбинантный асиалогликопротеин, выбранный из группы, состоящей из Е1 и Е2 ВГС в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. По желанию (необязательно) можно включить иммунологический адъювант.

Другим аспектом изобретения является реагент для иммуноанализа, включающий рекомбинантный асиалогликопротеин, выбранный из группы, состоящей из Е1 и Е2 ВГС в сочетании с подходящим носителем. Другой реагент для иммуноанализа по этому изобретению состоит из рекомбинантного асиалогликопротеина, выбранного из группы, состоящей из Е1 и Е2 ВГС, в сочетании с подходящей выявляемой меткой.

Еще один аспект изобретения касается димеров и агрегатов более высокого порядка Е1 и/или Е2. Одним из видов изобретения является комплекс Е2. Другой разновидностью изобретения является гетеродимер Е1:Е2.

Еще одним аспектом изобретения является композиция ВГС-вакцины, состоящая из агрегатов Е1:Е2 и фармацевтически приемлемого носителя.

Еще одним аспектом изобретения является способ очистки комплексов Е1:Е2.

Еще одним аспектом изобретения является способ размножения ВГС в культуре клеток, включающий: (а) предоставление клетки, экспрессирующей рецептор, выбранный из группы, состоящей из рецептора маннозы и рецептора асиалогликопротеина; (б) инфицирование клетки ВГС; (в) выращивание инфицированной клетки. Предпочтительно, чтобы клетка экспрессировала рекомбинантный рецептор.

Способы проведения изобретения

А. Определения

Термин "асиалогликопротеин" относится к гликозилированному протеину, который в значительной степени освобожден от остатков сиаловой кислоты. Асиалогликопротеины можно получить рекомбинантным способом, либо путем очистки из культуры клеток, либо из естественных источников.

В настоящее время предпочтительны асиалогликопротеины, получающиеся из ВГС, предпочтительно, гликопротеины Е1 и Е2, наиболее предпочтительно, рекомбинантные Е1 и Е2 (pЕ1 и pЕ2). Белок, "в значительной степени освобожденный" от сиаловой кислоты, подпадает под это определение, если количество остатков сиаловой кислоты незначительно влияет на связывание гликопротеина с протеинами, связывающими маннозу, такими как GNA. Такая степень сиалилирования, в общем, достигается, если сиаловая кислота составляет менее 40%

общего количества N-связанных углеводов, более предпочтительно - менее 30%, более предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 10, более предпочтительно менее 5% и самое предпочтительное менее 2%.

Термин "Е1" используется здесь для обозначения белка или полипептида, экспрессированного в пределах первых 400 аминокислот полипротеина ВГС, участка, иногда упоминаемого как протеин Е или S. В естественном виде он является гликопротеином в 35 кД, строго связанным с оболочкой. У большинства природных штаммов ВГС протеин Е1 закодирован в вирусном полипротеине после протеина С (сердцевины).

Протеин Е1 располагается приблизительно между 192 и 383 аминокислотами полноразмерного полипротеина. В термин "Е1" здесь также включаются аналоги и усеченные мутанты, дающие перекрестные иммунологические реакции с естественным Е1.

Термин "Е2" используется здесь для обозначения белка или полипептида, экспрессируемого в пределах первых 900 аминокислот полипротеина ВГС, участка, иногда упоминаемого как белок NSI. В естественном виде он является гликопротеином в 72 кД, строго связанным с оболочкой. У большинства естественных штаммов ВГС протеин Е2 следует за протеином Е1.

Протеин Е2 располагается приблизительно между 384 и 820 аминокислотами. В понятие "Е2" здесь также включаются аналоги и усеченные мутанты, дающие перекрестные иммунологические реакции с естественным Е2.

Термин "агрегат" используется здесь для обозначения комплекса Е1 и/или Е2, содержащего более одного мономера Е1 или Е2. В рамках этого определения димеры Е1:Е1 и Е2:Е2 и гетеродимеры Е1:Е2 являются "агрегатами". Композиции изобретения могут также включать более крупные агрегаты с молекулярной массой, превышающей 800 кД.

Термин "частица" используется здесь для обозначения агрегата Е1, Е2 или Е1/Е2, видимого при электронной микроскопии и имеющего размеры не менее 20 нм. Предпочтительными частицами являются те, которые имеют приблизительно сферическую форму и диаметр около 40 нм при электронной микроскопии.

Термин "очищенные" здесь применяют по отношению к протеинам в композиции, где заданный протеин составляет не менее 35% всего белкового компонента композиции. Предпочтительно, заданный протеин составляет не менее 40%, более предпочтительно не менее 50%, более предпочтительно не менее 60%, еще более предпочтительно не менее 70%, даже предпочтительнее не менее 80%, даже предпочтительнее не менее 90% и предпочтительнее всего не менее 95% всего белкового компонента. Композиция может содержать другие соединения, такие как углеводы, соли, липиды, растворители и т.п., не нарушая определения процента очистки, здесь применяющегося. "Изолированный" асиалогликопротеин ВГС означает композицию асиалогликопротеина ВГС,

очищенную не менее чем на 35%.

"Протеин, связывающий маннозу", здесь означает лектин или другой протеин, специфически связывающийся с протеинами с гликозилированием, оканчивающимся на маннозу (например, асиалогликопротеины), например лектины, связывающие маннозу, антитела, специфичные для гликозилирования, оканчивающегося на маннозу, протеин рецептора маннозы (R.A.B. Ezekowitz et al., J. Exp. Med. (1990) 176-1785-94), протеины рецептора асиалогликопротеина (H. Kurata et al., J. Biol. Chem. (1990) 265: 11295-98), сывороточный протеин, связывающий маннозу, (1. Schuffenecker et al., Cytoget. Coll. Genet. (1991) 56: 99-102; K. Sastry et al., J. Immunol. (1991) 147: 692-97), сывороточный протеин, связывающий асиалогликопротеин и т.п. Лектины, связывающие маннозу, включают, например, GNA, конканавалин А (КонА) и другие лектины со сходными связывающими свойствами.

Термин "лектин GNA" относится к агглюнину растения *Galanthus nivalis*, продажному лектину, который связывает гликопротеины, оканчивающиеся маннозой.

"Рекомбинантным" гликопротеином здесь называется гликопротеин, экспрессированный с рекомбинантного полинуклеотида, в котором структурный ген, кодирующий гликопротеин, экспрессируется под контролем регуляторной последовательности, не примыкающей в естественных условиях к структурному гену, или в котором структурный ген модифицирован.

Например, можно создать вектор, в котором структурный ген E1 помещен под контроль функционального фрагмента промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы дрожжей (ГАФДГ). В настоящее время предпочтительным промотором для использования в дрожжах является гибридный промотор АДГ2/ГАФ, описанный в патенте США N 4.880.73, для которого используется фрагмент промотора ГАФДГ в сочетании с предшествующей активационной последовательностью, полученной из алкогольдегидрогеназы 2. Модификации структурного гена могут включать замещение различных кодонов вырожденными кодонами (например, использовать предпочтительные для хозяина кодоны, элиминировать или создать сайты рестрикции, контролировать образование шпилек и т.д.) и замещение, вставку или удаление ограниченного числа кодонов, кодирующих различные аминокислоты (предпочтительно не более 10%, более предпочтительно менее 5% от размера естественной аминокислотной последовательности подлежат изменению) и т.п. Таким же образом "рекомбинантным" рецептором назван протеин рецептора, экспрессированный с рекомбинантного полинуклеотида, в котором структурный ген, кодирующий рецептор, экспрессируется под контролем регуляторных последовательностей, не примыкающих в естественных условиях к структурному гену, или в котором структурный ген модифицирован.

Термин "изолированный полипептид" относится к полипептиду, в значительной степени свободному от других компонентов

вируса ВГС, в особенности от полинуклеотидов. Полипептидная композиция является "существенно свободной" от других компонентов, если вес полипептида в композиции составляет не менее 70% веса полипептида и другого компонента, с ним соединенного, более предпочтительно - не менее 80%, еще более предпочтительно - около 90% и самое предпочтительное - 95% или более.

Например, композиция, содержащая 100 мкг/мл E1 и только 3 мкг/мл других компонентов ВГС (например, ДНК, липиды и т. д.), является существенно свободной от "других компонентов ВГС" и таким образом является композицией изолированного полипептида в рамках этого определения.

Термин "лидер секреции" относится к полипептиду, который при кодировании на аминоконце белка вызывает после трансляции секрецию белка в культуральную среду хозяйских клеток. Лидер секреции, как правило, получается из используемой клетки хозяина.

Например, в число лидеров секреции, подходящих для использования в дрожжах, входит лидер альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* (см. патент США N 4.870.008).

Термин "низший эукариот" относится к клеткам-хозяевам, таким как дрожжи, грибы и т. п. Низшие эукариоты являются, как правило, (не обязательно) одноклеточными. Предпочтительными эукариотами являются дрожжи, особенно виды, относящиеся к *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* и т.п. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. Carlsbergensis* и *K. lactis* являются наиболее часто используемыми дрожжевыми хозяевами и общепринятыми грибковыми хозяевами.

Термин "высший эукариот" относится к клеткам-хозяевам, полученным от высших животных, таких как млекопитающие, рептилии, насекомые и т.п.

В настоящее время предпочтительны высшие эукариотные клетки-хозяева, полученные от китайского хомячка (например, CHO-клетки яичника китайского хомячка), обезьян (например, клетки COS), человека и насекомого (например, *Spodoptera frugiperda*). Клетки-хозяева могут быть представлены в виде суспензии или культуры в матрасе, культур ткани, культур органов и т.п.

Термин "модулятор кальция" относится к соединению, способному секвестировать или связывать ионы кальция в эндоплазматическом ретикулуме или изменять концентрацию ионов кальция в ЭПР путем действия на белки, регулирующие обмен кальция (например, белки кальциевых каналов, кальциевые насосы и т. д.). В число подходящих модуляторов кальция входит, например, тапсигаргин, EGTA (этиленгликоль-бис/бета-аминоэтиловый эфир/- N, N, N', N' - тетрауксусная кислота). В настоящее время предпочтительным модулятором является тапсигаргин (см., например, O. Thastrup et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1990) 87:2466-70).

Термин "иммуногенный" относится к способности вещества вызывать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ либо в одиночку, либо в связанном с носителем

состояния в присутствии адьюванта или без него. "Нейтрализация" относится к иммунному ответу, блокирующему инфекционность, либо частично, либо полностью, инфекционного возбудителя. "Вакцина" является иммуногенной композицией, способной осуществить защиту от ВГС, частичную или полную, применимой для лечения индивидуума.

Термин "биологическая жидкость" относится к жидкости, полученной из организма, такой как сыворотка, плазма, слюна, желудочный сок, слезы и т.п. В общем, биологические жидкости подлежат скринингу на присутствие частиц ВГС. Некоторые биологические жидкости используются как источник других продуктов, таких как свертывающие факторы (например, фактор VIII:C), сывороточный альбумин, гормон роста и т.п. В таких случаях важно, чтобы источник биологической жидкости был свободен от загрязнения вирусом, таким как ВГС.

Б. Общий способ

Область E1 генома ВГС описывается в EP 388.232 как область "E", тогда как E2 описывается как "NS1". Область E1 включает приблизительно аминокислоты 192-383 полноразмерного вирусного полипротеина. Область E2 включает приблизительно аминокислоты 384-820. Полные последовательности прототипов этих протеинов (штамм ВГС-1) доступны специалисту (см. EP 388.232), так как являются общими способами клонирования и экспрессии протеинов. Как E1, так и E2, могут экспрессироваться с полинуклеотида, кодирующего первые 850-900 аминокислот полипротеина ВГС: посттрансляционное процессирование в большинстве эукариотных клетках-хозяевах расщепляет первоначальный полипротеин на C, E1 и E2. Можно усекав 5' конец кодирующей области для того, чтобы уменьшить величину продуцируемого протеина C.

Экспрессию асиалогликопротеинов можно получить множеством способов. Например, можно получить экспрессию в низших эукариотах (таких, как дрожжи), которые в норме не добавляют остатки сиаловой кислоты к гликозилированным протеинам. В дрожжевых экспрессионных системах в настоящее время предпочтительно пользоваться лидером секреции, таким как лидер альфа- фактора *S.cerevisial*, так чтобы протеин экспрессировался после трансляции в питательную среду. Также в настоящее время предпочтительно пользоваться мутантами с дефицитом гликозилирования, таким как *rmg1*, так как эти мутанты обеспечивают только гликозилирование сердцевины и часто секретируют гетерологичные белки с высокой эффективностью (H.K. Pudolph et al., *Cell* (1989) 58:133-45). Альтернативно можно использовать другие виды дрожжей, такие как *Pichia pastaris*, которые экспрессируют гликопротеины, содержащие 8-9 остатков маннозы в виде, напоминающем, как считают, тип гликозилирования сердцевины, наблюдающийся у млекопитающих в *S.cerevisia*.

Альтернативно можно вызвать экспрессию в клетках млекопитающих и заблокировать терминальное гликозилирование (добавление сиаловой кислоты). Рекомбинантные конструкции будут предпочтительно включать

сигнал секреции, чтобы гарантировать, что протеин направлен в эндоплазматический ретикулум. Транспорт в аппарат Гольджи, по-видимому, блокируют сами E1 и E2: высокий уровень экспрессии E1 или E2 в клетках млекопитающих, кажется, прекращает секрецию всех белков клетки в эндоплазматическом ретикулуме или в аппарате Гольджи. Можно дополнительно использовать мутант с дефектом гликозилирования. См., например, P. Stanley, *Ann. Rev. Genet.* (1984) 18: 525-52. В случае гликозилирования или транспорта мутант экспрессирует E1 или E2 с сиалилированием, тогда терминальный остаток сиаловой кислоты можно удалить обработкой нейраминидазой.

Дрожжи в дальнейшем нужно стимулировать кальциевым модулятором, для того чтобы получить секрецию протеина в эндоплазматический ретикулум. В число подходящих модуляторов входят тапсигаргин и A23817 (см., например, O.Thastup et al., *Proc. Nat. Accd. Sci. USA* (1990) 87:2466-70). Например, можно экспрессировать большое количество E1 или E2 внутриклеточно в клетках млекопитающих (например, клетки CHO, COS, HeLa и т.п.) путем трансфекции вектором рекомбинантного вируса осповакцины. Выждав, пока протеин экспрессируется и накопится в эндоплазматическом ретикулуме, клетки обрабатывают кальциевым модулятором в концентрации, достаточно большой, чтобы вызвать освобождение содержимого ЭР. Затем белок извлекается из культуральной среды, которая замещается для следующего цикла.

Дополнительно может оказаться выгодным экспрессировать усеченную форму протеина оболочки. Как E1, так и E2, по-видимому, обладают высокогидрофобным доменом, который, очевидно, удерживает протеин внутри эндоплазматического ретикулума и препятствует эффективному выделению. Поэтому можно по желанию убрать части последовательности, обнаруженные в одной или нескольких областях аминокислот 170-190, 260-290 или 330-380 у E1 (нумерация от начала полипротеина) и 660-830 у E2 (см., например, рисунок 20-1 в EP 388.232). Похоже, что по крайней мере один из этих гидрофобных доменов образует трансмембранную область, которая не является существенной для антигенности протеина и поэтому может быть удалена без ущерба. Какую область лучше удалить, можно определить немногими экспериментами по удалению, проведенными обычным образом. Удаление гидрофобного 3'-конца у E2 приводит к секреции части экспрессированного E2 с сиалилированием секретируемого протеина.

Для получения экспрессии можно использовать любой из ряда векторов. Низшие эукариоты, такие как дрожжи, обычно трансформируются плазмидами методом преципитации фосфатом кальция или подвергаются трансфекции рекомбинантным вирусом. Векторы могут независимо размножаться в клетке-хозяине или могут интегрироваться в геном клетки-хозяина. Высшие эукариоты могут трансформироваться плазмидами, но обычно они инфицируются рекомбинантным вирусом, например

рекомбинантным вирусом осповакцины. Вирус осповакцины особенно предпочтителен, так как инфицирование вирусом осповакцины останавливает экспрессию белков клетки-хозяина. В настоящее время в число предпочтительных клеток-хозяев входят линии клеток HeLa и плазмоцитомы. В представленной системе это означает, что E1 и E2 накапливаются как главные гликозилированные разновидности в ЭР хозяина.

Так как pE1 и pE2 будут преобладающими гликопротеинами с маннозным окончанием, их легко выделить в чистом виде из клетки при помощи лектинов, таких как агглютинин *Galanthus nivalus* (GNA), который связывает терминальные остатки маннозы

Протеины, которые в естественном виде экспрессируются как гликопротеины с маннозным окончанием, в физиологии млекопитающих встречаются относительно редко. В большинстве случаев гликопротеин млекопитающих имеет маннозное окончание только в транзитной промежуточной форме, образующейся в процессе гликозилирования. То что белки оболочки ВГС, рекомбинантно экспрессированные, содержат оканчивающийся на маннозу гликозильный остаток или (в меньшей степени) N-ацетилглюкозамин, означает, что белки ВГС и цельные вироны можно отделять и частично очищать от эндогенных протеинов при помощи лектинов, специфичных для терминальной маннозы или N-ацетилглюкозамина. Рекомбинантные протеины кажутся аутентичными и считаются в сущности идентичными белкам оболочки, обнаруживаемым в зрелом свободном вирионе или форме протеина, связанной с оболочкой клетки. Поэтому можно использовать лектины, такие как GNA для протеинов с маннозным окончанием и WCA (агглютинин семян пшеницы) и их эквиваленты для протеинов с N-ацетилглюкозаминным окончанием. Можно пользоваться лектинами, фиксированными на твердой фазе (например, колонкой лектин-сефароза), чтобы отделить E1 и E2 от надосадочной жидкости культуры клеток или от других жидкостей, например, для очистки во время получения антигенов для вакцины или для использования в иммуноанализе.

Альтернативно можно предоставить подходящий лектин для выделения E1, E2 или вирионов ВГС из жидкости или тканей лиц с подозрением на ВГС инфекцию. Так как гликопротеины с маннозным окончанием относительно редки, такая процедура должна служить очистке белков, присутствующих в пробе, существенно ослабляя интенсивность фона. После связывания лектинами протеин ВГС может быть обнаружен при помощи антиВГС-антител.

Если присутствуют цельные вироны, можно альтернативно обнаружить нуклеиновые кислоты ВГС при помощи методик полимеразной цепной реакции (PCR) или другими способами накопления нуклеиновых кислот, направленными на сохранение областей генома ВГС (например, не кодирующей области 5'). Этот способ позволяет изолировать и дать характеристику различных штаммов ВГС независимо от отклонений или вариантов антигенности, например, в случаях, когда новый штамм не

дает перекрестной иммунной реакции со штаммом, применявшимся для получения антител. Есть много других способов использовать преимущества уникального распознавания гликопротеинов с маннозным окончанием при помощи отдельных лектинов.

Например, можно инкубировать пробы, предположительно содержащие вироны или протеины ВГС с биотин- или авидинмеченными лектинами, и осаждать протеин-лектиновый комплекс при помощи авидина или биотина. Можно также использовать сродство лектина к протеинам ВГС, чтобы нацелить соединения на вироны с терапевтической целью, например, конъюгировав антивирусное соединение с GNA. Альтернативно можно использовать подходящие лектины для того, чтобы удалить гликопротеины с маннозным окончанием из сыворотки или плазмы, снизив или исключив таким образом риск заражения ВГС.

В настоящее время предпочтительно изолировать асиалогликопротеины E1 и/или E2 из неочищенных лизатов клеток путем инкубирования с иммобилизованным протеином, связывающим маннозу, особенно с лектином, таким как Kona или GNA. Клетки лизируются, например, механическим разрушением в гипотоническом буфере, потом лизат центрифугируют, чтобы приготовить постнуклеарный лизат, и еще раз центрифугируют, чтобы получить неочищенную фракцию микросомальных мембран. Неочищенная фракция мембран последовательно солибилизируется в буфере, содержащем детергент, такой как Triton X-100, NP40 или им подобный. Этот экстракт с детергентом в дальнейшем очищают от нерастворимых частиц центрифугированием и образовавшийся осветленный лизат инкубируют в хроматографической колонке, содержащей иммобилизованный протеин, связывающий маннозу, предпочтительно GNA, фиксированный на твердой подложке, такой как агароза или сефароза, в течение времени, достаточного для связывания, обычно на 16-20 часов. Затем суспензию пропускают через колонку до тех пор, пока E1/E2 начинают появляться в элюенте, затем - инкубируют в колонне в течение времени, достаточного для связывания, обычно около 12-24 часов. Связанный материал затем промывается дополнительным количеством буфера с детергентом (например, Triton X-100, NP40 или им подобным) и элюируется маннозой для того, чтобы получить очищенный асиалогликопротеин.

При элюции предпочтительно элюировать только до тех пор, пока в элюате не начнет появляться протеин, в этот момент элюирование останавливается и колонка уравнивается в течение 2-3 часов, прежде чем приступить к элюированию протеина. Полагают, что это дает достаточно времени для того, чтобы прореагировали оставшиеся крупные белковые агрегаты. В случаях, когда E1 и E2 экспрессируются вместе в естественном виде (т.е. без процессирования домена связи с оболочкой), существенная часть асиалогликопротеинов появляется в виде агрегатов E1:E2. При исследовании под электронным микроскопом значительная часть этих агрегатов выглядит как частицы почти сферической формы

диаметром около 40 нм, что соответствует предполагаемым размерам интактного вируса. Эти частицы кажутся самоорганизующимися вирусными субъединицами.

Ожидается, что эти агрегаты должны образовывать четвертичную структуру, очень схожую со структурой аутентичных частиц вириона ВГС, и поэтому ожидается, что они будут служить как высокоиммуногенная вакцина.

Комплексы E1/E2 могут быть далее очищены гель-хроматографией на основной среде, например фрактогель-ДЭАЭ или ДЭАЭ-сефароза. При помощи фрактогель-ДЭАЭ гель-хроматографии можно получить комплексы E1/E2, очищенные, приблизительно, до 60-80%. E1 можно далее очистить обработкой лизинпротеазой, потому что у E1 есть 0-1 Лиз остаток. Обработка комплекса лизинпротеазой разрушает E2 и позволяет легко отделить E1.

Тканевая специфичность ВГС вместе с наблюдением, что гликопротеины оболочки ВГС имеют маннозные окончания, наводят на мысль, что вирус использует рецептор маннозы или асиалогликопротеиновый рецептор (АСГР) для того, чтобы проникнуть в клетку-хозяина. Маннозные рецепторы обнаружены на макрофагах и клетках синусоидов печени, тогда как АСГР обнаружен на паренхиматозных гепатоцитах. Поэтому должно быть возможно выращивать ВГС в клетках-хозяевах, экспрессирующих один или оба эти рецептора. Можно либо использовать первичные культуры клеток, которые естественно экспрессируют этот рецептор, в условиях, сохраняющих рецептор, или можно ввести в другую линию клеток, такую как HeLa, CHO, COS и т.п., вектор, способствующий экспрессии этого рецептора.

Клонирование рецептора маннозы и его трансфекция и экспрессия в фибробластах были продемонстрированы M. E. Maylor et al. J.Biol. Chem (1990) 265:12156-62.

Клонирование и секвенирование АСГР описаны K. Drickamer et al., J. Biol. Chem (1984) 259: 770-78 и M. Spiess et.al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA (1985) 82:6465-69; трансфекция и экспрессия функционального АСГР в HTC гомозитных типизирующих клетках крыс описана M. McPhaul и P.Berg, Pros. Nat Acad. Sci. USA (1986) 83:8863-67 и M.McPhaul и P.Berg, Mc1. Cell Biol. (1987) 7: 1841-47.

Таким образом, возможна трансфекция одного или обоих рецепторов в подходящие линии клеток и использование получившихся клеток в качестве хозяина для размножения ВГС в культуре. Серийные пассажы ВГС в такой культуре должны привести к возникновению ослабленных штаммов, подходящих для использования в качестве живой вакцины. Можно либо использовать первичные культуры клеток, которые естественно образом экспрессируют этот рецептор, создавая условия, при которых рецептор сохраняется, или можно произвести трансфекцию другой линии клеток, такой как HeLa, CHO, COS и т.п., вектором, обеспечивающим экспрессию рецептора.

Клонирование рецептора маннозы и его трансфекция и экспрессирование в фибробластах были показаны Taylor et al. (см. выше), тогда как трансфекция и экспрессия функционального АСГР в гомозиготных типизирующих клетках крыс

описана McPhaul et al. (см. выше).

В настоящее время предпочтительно пользоваться бессмертной линией клеток, трансфицированных одним или обоими рекомбинантными рецепторами.

5 Иммуногенные композиции можно приготовить известными способами. Настоящие композиции включают иммуногенное количество полипептида, например композиции частиц E1, E2 или E1/E2, обычно соединенного с фармацевтически приемлемым носителем, предпочтительно далее включающие адъювант.

10 Если желателен "коктейль" - комбинация полипептидов ВГС, для повышения эффективности можно, например, смешать вместе антигены E1 и E2. Агрегаты вирусоподобных частиц E1/E2 представляют, как ожидается, особенно полезный вакцинный антиген. Иммуногенные композиции можно вводить животным, чтобы вызвать образование антител, или получить источник антител, или создать защитный иммунитет у животного.

20 Фармацевтически приемлемые носители включают любой носитель, который сам не вызывает образования антител, опасных для индивидуума, получающего композицию. Подходящими носителями обычно являются крупные, медленно разрушающиеся макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полилактоикислоты, полигликолевые кислоты, полимеры аминокислот, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы. Такие носители хорошо известны специалистам.

30 В число предпочтительных адъювантов, усиливающих эффективность композиции, входят, но ими не ограничиваются: гидроксид алюминия (алум), N-ацетил-мурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr - MDP), найденный в патенте США N 4.606.918, N-ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (hor-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланил-2-(1'-2'-дипальмитоил-Sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин (MTP-PE) и R1B1, который содержит три компонента, извлеченные из бактерий, монофосфориллипид A, димиколат трехалозы и скелет клеточной стенки (MPL + TDM + CWS) в 2% эмульсии сквален/твин 80.

50 Дополнительно можно использовать такие адъюванты, как стимулон (Cambridge Bioscience, Morcester, MA). Далее, в препаратах, не предназначенных для людей, и в исследовательских целях можно пользоваться полным адъювантом Фрейнда(ПАФ) и неполным адъювантом Фрейнда (НАФ).

55 Иммуногенные композиции обычно будут содержать фармацевтически приемлемые наполнители, такие как вода, физиологический раствор, глицерин, этанол и т.д. Дополнительно в число таких наполнителей могут быть включены вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные вещества для поддержания pH и т.п.

60 Типичные иммуногенные композиции готовятся в форме, пригодной для инъекций, либо как жидкий раствор, либо как эмульсия, также можно приготовить сухие формы,

пригодные для растворения в жидком наполнителе с образованием раствора или суспензии перед инъекцией. Препараты также могут быть эмульгированы или инкапсулированы в липосомы для усиления адъювантного эффекта.

Иммуногенные композиции, используемые как вакцины, включают иммунологически эффективное количество полипептида ВГС, а также другие вышеупомянутые компоненты по потребности.

"Иммунологически эффективное количество" означает, что введение такого количества индивидууму либо однократно, либо как одна из нескольких последующих доз, эффективно для лечения, как определено выше. Это количество варьирует, в зависимости от здоровья и физического состояния индивидуума, которому оно вводится, таксономической группы индивидуумов, подвергающихся воздействию (например, человекообразные приматы, приматы и т.д.), способности иммунной системы индивидуума синтезировать антитела, степени желаемой защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом, штамма ВГС, вызвавшего инфекцию и других, имеющих значение факторов.

Ожидается, что это количество будет колебаться в довольно широких пределах, которые можно определить при обычных испытаниях.

Эти самособирающиеся агрегаты E1/E2 могут также служить носителями вакцины для гетерологичных (не ВГС) гаптепов таким же образом, как поверхностный антиген гепатита В (см. европейскую патентную заявку 174.444). При таком применении агрегаты E1/E2 представляют иммуногенный носитель, способный стимулировать иммунный ответ на гаптены или антигены, конъюгированные с агрегатом.

Антиген можно конъюгировать либо обычными химическими способами, либо можно клонировать его в ген, кодирующий E1 и/или E2, с локализацией, соответствующей гидрофильной области белка.

Иммуногенные композиции принято вводить парентерально, обычно, путем подкожных или внутримышечных инъекций. Дополнительные прописи, подходящие для других способов введения, включают прописи для перорального введения и суппозиторий. Лечебная дозировка может быть введена однократно или в несколько приемов по схеме. Вакцину можно вводить в соединении с другими иммунорегулирующими средствами.

В. Примеры

Данные ниже примеры представлены в качестве дальнейшего руководства для практического специалиста и не должны рассматриваться как какие-либо ограничения изобретения.

ПРИМЕР 1 (Клонирование и экспрессия)

(А).

Векторы строили из плазмид, содержащих 5'-часть генома ВГС, как описано в EP 318.216 и EP 388.232. Кассета ВГС (S/B) содержит фрагмент ДНК Stul - Bgt II, кодирующий 5'-конец полипротеина от Met¹ до Лей⁹⁰⁶, начиная с нуклеотида-63, относящегося к Met¹. Сюда входят белок сердцевин (С), протеин E1 (также иногда упоминаемый как S), протеин E2 (также

упоминаемый как NSI) и 5'-часть области NS2a. После экспрессии этого конструкта его разделяют протеолизом на отдельные белки С, E1 и E2.

5 Кассета ВГС (A/B) содержит фрагмент ДНК AраLI-BglII, кодирующий 5'-конец полипротеина от Met¹ до Лей⁹⁰⁶, начиная с нуклеотида-6, относящегося к Met¹. Сюда входят белок сердцевин (С), протеин E1 (также иногда упоминаемый как S), протеин E2 (также упоминаемый как NSI) и 5'-часть области NS2a.

10 После экспрессии этого конструкта отдельные протеины С, E1 и E2 получают протеолитической обработкой.

15 Кассета С-E1 (S/B) (часть Stul - BamHI) содержит 5'-конец от Met¹ до Иле³⁴⁰ (сайт BamHI в гене). Экспрессия этой кассеты приводит к экспрессии С и в какой-то степени усеченного E1 (E1'). Часть, срезанная с 3'-конца, является гидрофобной областью, которая считается служащей как сигнал трансляции.

20 Кассета NSI (B/B) (часть BamHI - BglII) содержит маленькую часть 3' от E1 (от Met³⁶⁴), весь E2 и часть NS2a (до Лей⁹⁰⁶). В этом конструкторе фрагмент E1 служит транслокационным сигналом.

25 Кассета TPA-NSI использует лидер активатора тканевого плазминогена человека (tPA) как транслокационный сигнал вместо 3'-части E1. Эта кассета содержит усеченную форму E2 от Гли⁴⁰⁶ до Глу⁶⁶¹, у которой утрачен гидрофобный конец 3'.

30 Каждая кассета встраивается в вектор pGEM3Z (Promega) с или без синтетической бета-глобиновой некодирующей последовательности для транскрипции и трансляции *in vitro*, пользуясь экспрессией T7 и ретикулоцита кролика.

35 Векторы рекомбинантного вируса осповакцины (rVV) готовили встраиванием кассет в плазмиду pSC11 (полученную от Dr. B. Moss, NIH), после чего следует рекомбинация с вирусом осповакцины, как описано Charkrabarty et al., Mol. Cell Biol. (1985) 5:3403-09.

(В).

40 Альтернативный экспрессирующий вектор получен путем встраивания ВГС (A/B) в pS59 (полученную от Dr. B. Moss NIH) между сайтами Stal и SpeI с последующей рекомбинацией с вирусом осповакцины, как описано Charkrabarty et al., Mol. Cell Biol. (1985) 5:3403-09.

(С).

45 Клетки HeLa собирали центрифугированием в течение 7 минут при 2000 об/мин при комнатной температуре в стерильных центрифужных флаконах емкостью 500 мл (ротор JA-10).

55 Осадки ресуспендировали в дополнительной культуральной среде (Joklik - модифицированная MEM Spenner среда + 5% лошадиной сыворотки и гентамицин) ("центрифужная среда") до окончательной концентрации $2 \cdot 10^7$ клеток/мл. Разрушенная ультразвуком неочищенная масса вируса vv/SC59 - ВГС добавлялась к множеству инфекции в 8 флашкообразующих единиц/клетку и смесь перемешивали 30 минут при 37°C. Затем инфицированные клетки переносили в центрифужный флакон, содержащий 8 л центрифужной среды, и

инкубировали в течение 3 дней при 37°C.

Затем культивированные клетки собирали центрифугированием и осадки ресуспендировали в буфере (10 мМ трис-HCL, pH 9,0, 152 мл). Затем клетки гомогенизировали гомогенизатором 40 мл Dounce (50 ударов) и ядра осаждали центрифугированием (5 минут, 1600 об/мин, 4 °C, ротор JA-20). Ядерные осадки ресуспендировали в трис-буфере (24 мл), регомогенизировали и снова осаждали, собирая все супернатанты.

Собранный лизат разделяли на порции в 10 мл и разрушали ультразвуком 3 x 30 минут в соникаторе в виде винного рога при средней мощности. Обработанный лизат (15 мл) наслаивали на 17 мл подушки из сахарозы (36%) в центрифужных пробирках SW 28 и центрифугировали в течение 80 минут при 13500 об/мин при 4°C для того, чтобы осадить вирус. Осадок вируса ресуспендировали в 1 мл трис-буфера (1 мМ трис-HCL, pH 9,0) и замораживали при -80°C.

ПРИМЕР 2 (Сопоставление продуктов *in vitro* и *in vivo*)

(A)

E1 и E2 экспрессировали оба *in vitro* и *in vivo* и метилы ³⁵S-Мет применявшиеся векторы, описанные выше, в примере 1. Клетки BSC-40 и HeLa инфицировали векторами rVV для экспрессии *in vivo*. Питательную среду и лизаты клеток исследовали на рекомбинантные белки. Проводили иммунопреципитацию продуктов человеческой ВГС иммунной сывороткой, тогда как протеины *in vitro* анализировали прямым методом. Образовавшиеся белки анализировали хроматографией SDS-PAGE.

Ретикулоцитарная экспрессионная система (pGFM3Z с ВГС (S/B) или ВГС (A/B) продуцировала протеины С, E1 и E2 с молекулярной массой приблизительно 18 кД, 35 кД и 72 кД соответственно. Лизаты клеток BSC-40 и HeLa, после трансфекции rVV, содержащим ВГС (S/B), ВГС (A/B) или С-E1 (S/B) давали те же самые протеины. Из-за того, что ретикулоцитарная система не обеспечивает эффективного процессирования в аппарате Гольджи и поэтому не предоставляет сиаловую кислоту, то продукты, как полученные *in vitro*, так и полученные *in vivo*, проявляют одинаковую подвижность, наводит на мысль, что протеины не сиализируют *in vitro*. Только вектор rVV, содержащий TPA-NSI, вызывает какую-то внеклеточную секрецию E2 с измененной подвижностью, соответствующей сиалилированию.

(B)

ВГС (S/B) экспрессировали *in vitro* и инкубировали с набором биотинилированных лектинов: GNA, SNA, PNA, WGA и КонА.

После инкубации комплексы собирали на авидин-акриловых шариках, промывали, элюировали буфером Лэмли для образца и анализировали хроматографией SDS-PAGE. Результаты показали, что E1 и E2 фиксированы на GNA и КонА, что указывает на наличие маннозы. GNA связывается с терминальными маннозными группами, тогда как КонА связывается с любой альфа-связанной маннозой. Отсутствие связывания с SNA, PNA и WGA указывает, что ни один из белков не содержит сиаловую

кислоту, галактоза-N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин.

(C)

E1 и E2 с радиоактивной меткой получали в клетках BSC - 40 путем инфицирования rVV, содержащим ВГС (S/B) (vv/SC11-ВГС) и производили иммунопреципитацию

человеческой ВГС⁺ иммунной сывороткой. Половину осажденного материала обрабатывали нейраминидазой в течение ночи, чтобы удалить любую сиаловую кислоту.

После обработки обработанные и необработанные протеины анализировали хроматографией SDS-PAGE. Не наблюдалось значительного различия в подвижности, что указывает на отсутствие сиализирования *in vivo*.

(D)

E1 и E2 с радиоактивной меткой получали в клетках BSC-40 путем инфицирования rVV, содержащим ВГС (A/B) (vv/S С 59-ВГС), и производили либо иммунопреципитацию ВГС⁺ сывороткой человека, либо осаждали биотинилированным лектином GNA, связанным с акриловыми шариками, используя vv/S 11, свободный от ВГС последовательностей, в качестве контроля. Преципитаты исследовали хроматографией SDS-PAGE. Данные показали, что E1 и E2 были главными разновидностями протеинов с маннозным окончанием в vv/SC 59-ВГС инфицированных клетках. GNA также эффективно, как антисыворотка человека, осаждал E1 и E2 из среды культуры клеток. Наблюдался компонент в 25 кД, но он казался специфическим для клеток, инфицированных вирусом осповакцины.

ПРИМЕР 3 (Очистка при помощи лектина)

(A)

В клетки HeLa инокулировали массу очищенного vv/SC 59-ВГС вируса с высоким титром при множестве инфекции в 5 бляшкообразующих единиц/клетку и смесь перемешивали 30 минут при 37°C. Затем инфицированные клетки переносили в центрифужный флакон, содержащий 8 л центрифужной среды и инкубировали 3 дня при 37°C. Клетки снова собирали центрифугированием и ресуспендировали в гипотоническом буфере (20 мМ HEPES, 10 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 120 мл) на льду. Затем клетки гомогенизировали гомогенизатором Dounce (50 ударов) и ядра осаждали центрифугированием (5 минут, 1600 об/мин, 4 °C, ротор JA-20). Осадки собирали, ресуспендировали в 48 мл гипотонического буфера, повторно регомогенизировали, центрифугировали, снова собирали и замораживали при -80°C.

Затем замороженные супернатанты размораживали и фракцию микросомальных мембран из пост-нуклеарного лизата изолировали центрифугированием в течение 20 минут в роторе JA-20 при 13500 об/мин при 4°C. Супернатант удаляли отсасыванием.

Осадки взбалтывали в 96 мл детергентного буфера (20 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DDT, 0,5% тритон-X-100, pH 7,5) и гомогенизировали (50 ударов). Продукт осветляли центрифугированием в течение 20 минут при 13500 об/мин 4°C и собирали супернатанты.

Колонка с GNA-агарозой (1 см x 3 см, 3 мг GNA/ мл шариков, 6 мл объем сорбента,

Vector Labs, Burlingame, CA) предварительно уравнивалась детергентным буфером. Образец супернатанта вносили в колонку с рециркуляцией при скорости тока 1 мл/мин в течение 16-20 часов при 4°C. Затем колонку промывали детергентным буфером.

Очищенные протеины E1/E2 элюировали альфа-D-маннозидом (0,9 М в детергентном буфере) при скорости тока 0,5 мл/мин. Элюцию останавливали при появлении E1/E2 в элюенте и давали колонке вновь уравниваться в течение 2-3 часов. Фракции анализировали вестерн-блоттированием и окраской серебром. Пиковые фракции собирали вместе и облучали УФ для инактивации любых остатков вируса осповакцины.

(B)

Асиалогликопротеины E1 и E2, очищенные GNA-агарозой, подвергали седиментации в 20-60% глицерине. Градиенты разделяли и анализировали протеины методами SDS-PAGE и вестерн-блоттированием. Пятна зондировали GNA для идентификации E1 и E2.

Результаты указывают на присутствие гетеродимера E1:E2, осаждающегося с ожидаемой скоростью (т.е. позиция, характерная для протеина в 110 кД). Также появляются более крупные агрегаты протеинов оболочки ВГС. Также появлялись E2: E2 гомодимеры. Казалось, что E2 преобладал над E1 в более крупных разновидностях, хотя отдельные разновидности E1:E2 также выявлялись.

Более крупные агрегаты осаждались значительно скорее, чем тиреоглобулиновый маркер.

(C)

E1 и E2, очищенные GNA-агарозой, осаждали в градиенте 20-60% глицерина с 1 mM EDTA. Фракции анализировали SDS-PAGE с и без бета-меркаптоэтанола (ME). Количество E1 и E2 почти не зависело от присутствия ME, что указывало на отсутствие дисульфидных связей между гетеродимерами.

(D)

Комплексы E1/E2 (приблизительно 40% чистоты) анализировали на Coulter DM-4 анализаторе субмикронных частиц. Обнаружен материал в диапазоне 20-60 нм.

(E)

Комплексы E1/E2 (очищенные приблизительно на 40%) исследовали под электронным микроскопом с негативным контрастированием фосфорно-вольфрамовой кислотой.

На электронных микрограммах выявлено присутствие частиц сферической формы диаметром около 40 нм. Комплексы E1/E2 инкубировали с ВГС + иммунной сывороткой человека, потом исследовали под ЭМ с негативным контрастированием. Наблюдались комплексы антител, содержащие крупные агрегаты и более мелкие частицы.

ПРИМЕР 4 (Хроматографическая очистка)

(A)

Очищенный лектином GNA материал, приготовленный, как описано в примере 3 (0,5-0,8 мл), разводили в 10 раз буфером A (20 mM трис-Cl буфер, pH 8,0; 1 mM EDTA) и наносили на колонку Fractogel EMD DEAE-650 1,8 x 1,5 см (EM Separations, Gibbstown, New Jersey, каталожный N 16883), уравниваемую в буфере A.

Фракцию протеина, содержащую E1/E2,

элюировали тем же буфером со скоростью 0,2 мл/мин и собирали 1 мл фракций. Фракции, содержащие E1 и E2 (определенные по SDS-PAGE), соединяли и хранили при -80°C.

(B)

Материал, очищенный вышеуказанным способом (A) по результатам SDS-PAGE, был очищен на 60-80%. Идентификация полос предполагаемых E1 и E2 подтверждалась анализом N-терминальной

последовательности после осуществления методики переноса. Для этого материал E1/E2, очищенный Fractogel-DEAE, восстанавливали добавлением буфера Ламмли (pH 6,8, 0,06 M трис-Cl, 2,3% SDS, 10% глицерина, 0,72 M бета-меркаптоэтанола) и кипятили 3 минуты. Затем пробу загружали в 10% полиакриламидный гель.

После хроматографии SDS-PAGE протеин переносили на 0,2 мкм мембрану из поливинилиден-дифторида (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Полоски, соответствующие предполагаемым протеинам E1 и E2, вырезали из пятна и подвергали N-терминальному аминокислотному анализу, хотя при приготовлении материала не предпринимали особых мер для предотвращения аминотерминального блокирования. Первые 15 циклов показали, что образец E1 имеет последовательность: Тир-Глн-Вал-

Арг-Х-Сер-Тре-Гли-Х-Тир-Гис-Вал-Х-Асп-Асп, тогда как последовательность E2 была: Тре-Гис-Вал-Тре-Гли-Х-Х-Ала-Гли-Гис-Х-Вал-Х-Гли-Фен. Эти данные определения аминокислотной последовательности согласуются с тем, что ожидалось по соответствующим последовательностям ДНК.

Продукт E1/E2, очищенный, как описано выше, хроматографией Fractogel-DEAE, считается агрегированным на том основании, что большое количество E1 и E2 совместно элюируют в область свободного объема хроматографической колонки геля-фильтрации Bio-Sil TSK-4000 SW. Это указывает, что в естественных условиях значительное количество комплекса E1/E2 имеет молекулярную массу не менее 800 кД. Также наблюдалось присутствие материала E1/E2 с молекулярной массой около 650 кД.

Формула изобретения:

1. Асиалогликопротеин вируса гепатита С (HCV), выбираемый из группы, включающей усеченный гликопротеин, экспрессируемый из E1-района HCV, который содержит делецию в части последовательности, обнаруженной в области, покрывающей аминокислоты 330-380 E1-района, пронумерованного от начала полипротеина HCV, и усеченного гликопротеина, экспрессируемого из E2-района HCV, содержащего делецию в части последовательности, обнаруженной в области, покрывающей аминокислоты 660-830 E2-района, пронумерованного от начала полипротеина HCV.

2. Асиалогликопротеин по п.1, отличающийся тем, что упомянутый усеченный гликопротеин экспрессируется из E1-района HCV и содержит делецию в части последовательности, обнаруженной в области, покрывающей аминокислоты 330-380 E1-района, пронумерованного от начала полипротеина HCV.

3. Асиалогликопротеин по п.1, отличающийся тем, что упомянутый

усеченный гликопротеин экспрессируется из E2-района HCV и содержит делецию в части последовательности, обнаруженной в области, покрывающей аминокислоты 660-830 E2-района, пронумерованного от начала полипротеина HCV.

4. Иммуногенная композиция для диагностики, лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гепатита С, содержащая асиалогликопротеин вируса гепатита С (HCV) по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Способ индукции иммунного ответа антигеном у животного, включающий стадии: получения композиции, содержащей эффективное количество иммуногенной субстанции в фармацевтически приемлемом

носителе; и введения упомянутой композиции упомянутому животному, отличающийся тем, что иммуногенная субстанция содержит асиалогликопротеин HCV по любому из пп.1-3.

5 6. Способ иммуноанализа для выявления в биологическом образце антител к HCV, включающий получение биологического образца, получение полипептидного реагента, реакцию биологического образца с полипептидным реагентом при условиях, обеспечивающих образование комплексов антиген-антитело и определение образования комплекса антиген-антитело, содержащего упомянутый полипептидный реагент, отличающийся тем, что в качестве полипептидного реагента используют композицию по п.4.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60