(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 986 329**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2018 PCT/EP2018/052149**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2018 WO18138344**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2018 E 18702268 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3574000**

(54) Título: **Polipéptidos de la cápside de ORF2 del virus de la hepatitis E y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

30.01.2017 EP 17305097
28.07.2017 EP 17306010

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2024

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LARECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (20.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE(CNRS) (20.0%);
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE (20.0%) y
UNIVERSITÉ DE LILLE (20.0%)

(72) Inventor/es:

COCQUEREL-DEPROY, LAURENCE;
MONTPELLIER, CLAIRE;
DUBUISSON, JEAN y
GOFFARD, ANNE

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de la cápside de ORF2 del virus de la hepatitis E y usos de los mismos

Campo

La presente invención se encuentra en el campo de la medicina, en particular de la virología.

Antecedentes

El virus de la hepatitis E (HEV) es la causa principal de hepatitis viral transmitida entéricamente a nivel mundial, y es responsable de 20 millones de infecciones y 70.000 muertes cada año [1]. Aunque la infección por HEV es habitualmente autorresolutiva, se han descrito formas graves o infecciones crónicas, principalmente en pacientes inmunodeprimidos. También se ha informado de una alta tasa de mortalidad entre mujeres embarazadas. La infección por HEV también se ha asociado con trastornos extrahepáticos, incluyendo trastornos renales y neurológicos [2]. Cuatro genotipos (gt) son patógenos en seres humanos. gt1 y gt2 infectan exclusivamente a seres humanos, mientras que gt3 y gt4 son zoonóticos e infectan principalmente a animales que pueden transmitir el virus a los seres humanos. Recientemente, las infecciones por gt3 han surgido en el mundo occidental, probablemente debido a transfusiones de sangre contaminada y al consumo de alimentos contaminados [1]. El diagnóstico de la hepatitis E se basa en la detección de anticuerpos anti-HEV y/o ARN viral en suero del paciente [3]. Recientemente, se desarrolló un nuevo ensayo basado en la detección del antígeno de la proteína de la cápside del HEV (Wantaï Biologicals), especialmente para laboratorios sin instalaciones de diagnóstico molecular.

HEV es un virus de ARN de sentido positivo, cuasi-envuelto, que expresa tres marcos de lectura abiertos (ORF): ORF1, ORF2 y ORF3 [1]. ORF1 codifica para la poliproteína no estructural ORF1, que contiene varios dominios funcionales esenciales para la replicación viral. ORF2 codifica para la proteína de la cápside viral ORF2, que está implicada en el ensamblaje de partículas, uniéndose a las células huésped y produciendo anticuerpos neutralizantes. ORF3 codifica para una pequeña fosfoproteína multifuncional implicada en la morfogénesis y la salida de viriones. Aunque HEV es un virus sin envoltura en bilis y heces, se ha descrito que el suero del paciente y las partículas producidas en cultivo celular están asociados a los lípidos celulares, como para el virus de la hepatitis A [4], y presentan la proteína ORF3 en su superficie [5].

Se ha demostrado que el crecimiento de HEV en cultivo celular es muy difícil [5]. Sin embargo, se han adaptado varias cepas de HEV al cultivo celular, incluyendo la cepa de gt3 Kernow C-1, que contiene una inserción de una proteína ribosómica S17 humana de 58 aa [6]. Aunque estos sistemas han conducido a una mayor comprensión del ciclo de vida del HEV, todavía producen bajos títulos infecciosos, limitando el análisis bioquímico directo de proteínas virales y material infeccioso. Notablemente, se desconoce la secuencia exacta de la proteína ORF2 asociada a partículas infecciosas. Además, la ultraestructura de partículas nunca se ha estudiado robustamente mediante microscopía electrónica inmunitaria.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a:

- un polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2i) del virus de la hepatitis E aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1,
- un polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2g) del virus de la hepatitis E aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, y
- una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la presente invención.

La descripción detallada, las figuras y el ejemplo siguientes no se encuentran dentro del alcance de la presente invención y se presentan únicamente con propósitos de comprensión e ilustración.

Descripción detallada

La infección por virus de la hepatitis E (HEV) es la causa principal de hepatitis aguda a nivel mundial. Aproximadamente 2 mil millones de personas viven en zonas endémicas del HEV y están en riesgo de infección. El genoma del HEV codifica para 3 proteínas, incluyendo la proteína de la cápside ORF2. Los análisis detallados del ciclo de vida del HEV se han visto obstaculizados por la falta de un sistema de cultivo viral eficiente.

Los inventores realizaron estudios con partículas producidas en cultivo celular de HEV gt3 (HEVcc) y muestras de sangre y heces de pacientes. Las muestras se fraccionaron en gradientes y almohadillas de iodixanol. Se realizaron ensayos de infectividad *in vitro* y en ratones quiméricos con hígado humano. Las proteínas se

analizaron mediante enfoques bioquímicos y proteómicos. Las partículas infecciosas se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Los niveles de antígeno de HEV se midieron con ELISA de Wantaï.

Los inventores desarrollaron un sistema de cultivo celular eficiente y aislaron partículas de HEV que eran infecciosas *in vitro* e *in vivo*. Usando microscopía electrónica de transmisión, definieron la ultraestructura de HEVcc y partículas de muestras de heces y sueros de pacientes. También identificaron la secuencia precisa de la proteína de la cápside ORF2 asociada a partículas infecciosas (ORF2i) y la secuencia de la proteína ORF2g. De hecho, en células cultivadas y en muestras de pacientes, HEV produjo 3 formas de la proteína de la cápside ORF2: ORF2 infecciosa/intracelular (ORF2i), ORF2 glicosilada (ORF2g) y ORF2 escindida (ORF2c). La proteína ORF2i estaba asociada a partículas infecciosas, mientras que las proteínas ORF2g y ORF2c eran glicoproteínas de secreción masiva no asociadas a partículas infecciosas. ORF2g y ORF2c eran los antígenos más abundantes detectados en sueros de pacientes.

Por tanto, los inventores desarrollaron un sistema de cultivo celular y caracterizaron partículas de HEV; identificaron 3 proteínas de la cápside ORF2 (ORF2i, ORF2g y ORFc). Estos hallazgos supondrán un avance para la comprensión del ciclo de vida del HEV y mejorarán el diagnóstico.

Por consiguiente, el primer objeto de la presente divulgación se refiere a un polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2i) del virus de la hepatitis E que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO:1:

LPMLPAPPAGQPSGRRRGRRSGGAGGGFWGDRVDSQPFALPYIHPTNPFAADI
VSQSGAGTRPRQPPRPLGSAWRDQSQRPSAAPRRRSAPAGAAPLTAVSPAPDT
APVPDVDSRGAILRRQYNLSTSPLTSSVASGTNLVLYAAPLNPLLPLQDGTNT
HIMATEASNYAQYRVVRATIRYRPLVPNAVGGYAISISFWPQTTTTPTSVDMN
SITSTDVRILVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETTGVAEEEATSGLVMLCI
HGSPVNSYTNTPYTGALGLLDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYTSTARHRLRR
GADGTAELTTTAATRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLADTLLGGLPT
ELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGITIPHDIDLGDSRVV
IQDYDNQHEQDRPTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQATYGSSTNPM
YVSDTVTFVNVATGAQAVARSLDWSKVTLDGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGK
LSFWEAGTTRAGYPYNYNTTASDQILIENAAGHRVAISTYTTSLGAGPASISAV
GVLAPHSALAVLEDTVDYPARAHTFDDFCPECRTLGLQGCAFQSTIAELQRLK
TEVGKTRES

En particular, el polipéptido ORF2i de la presente divulgación no está glicosilado. Tal como se usa en el presente documento, el término “glicosilado” con respecto a un polipéptido significa que un resto de hidrato de carbono está presente en uno o más sitios de la molécula de polipéptido. En particular, un polipéptido glicosilado se refiere a un polipéptido que normalmente está modificado por la adición de N-glicano u O-glicano.

Según la divulgación, la masa del polipéptido ORF2i de la presente divulgación es de aproximadamente 80 kDa.

El segundo objeto de la presente divulgación se refiere a un polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2g) del virus de la hepatitis E que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO:2:

SGGAGGGFWGDRVDSQPFALPYIHPTNPFAADIVSQSGAGTRPRQPPRPLGSA
WRDQSQRPSAAPRRRSAPAGAAPLTAVSPAPDTAPVPDVDSRGAILRRQYNLSTSPLT
SSVASGTNLVLYAAPLNPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAQYRVVRATIRYRPLVPNA
VGGYAISISFWPQTTTTPTSVDMNSITSTDVRILVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRS
VETTGVAEEEATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYTGALGLLDFALELEFRNLTPGNTNT
RVSRYTSTARHRLRRGADGTAELTTTAATRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNL
ADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGITIPHDIDLG
DSRVVIQDYDNQHEQDRPTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQATYGSSTNP
MYVSDTVTFVNVATGAQAVARSLDWSKVTLDGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGKLSF
WEAGTTRAGYPYNYNTTASDQILIENAAGHRVAISTYTTSLGAGPASISAVGVLAPHS
ALAVLEDTVDYPARAHTFDDFCPECRTLGLQGCAFQSTIAELQRLKTEVGKTRES

En particular, el polipéptido ORF2g de la presente divulgación está glicosilado. Tal como se usa en el presente documento, el término "glicosilado" con respecto a un polipéptido significa que un resto de hidrato de carbono está presente en uno o más sitios de la molécula de polipéptido. En particular, un polipéptido glicosilado se refiere a un polipéptido que normalmente está modificado por la adición de N-glicano u O-glicano

Según la divulgación, la masa del polipéptido ORF2g de la presente divulgación es de aproximadamente 90-100 kDa.

En particular, el polipéptido ORF2i u ORF2g de la presente divulgación puede producirse mediante métodos de síntesis peptídica automatizados convencionales o mediante expresión recombinante. Los principios generales para diseñar y preparar proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Otro objeto de la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que codifica para el polipéptido ORF2i u ORF2g de la presente divulgación. En particular, el ácido nucleico de la presente divulgación es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector viral. Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula huésped, para transformar el huésped y fomentar la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Los polipéptidos ORF2i u ORF2g de la presente divulgación son particularmente adecuados para producir anticuerpos específicos para dichos polipéptidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como Fab', Fab, F(ab')2 y anticuerpos de dominio único (DAB). En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados en conjunto CH). Las regiones variables de las cadenas tanto ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad con respecto al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas, tales como asociación de cadenas de anticuerpos, secreción, movilidad transplacentaria, unión al complemento y unión a los receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están compuestos por residuos que provienen principalmente de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) o hipervariables. Ocasionalmente, los residuos de las regiones de entramado (FR) o no hipervariables influyen en la estructura general del dominio y, por tanto, en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que, juntas, definen la especificidad y afinidad de unión de la

región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Cada una de las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tiene tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Por tanto, un sitio de unión a antígeno incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada región V de cadena pesada y cadena ligera. Las regiones de entramado (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

La especificidad puede determinarse relativamente mediante ensayos de unión o de unión competitiva, usando, por ejemplo, instrumentos de Biacore, tal como se describe en otra parte en el presente documento. La especificidad puede mostrarse, por ejemplo, mediante una razón de afinidad/avidez de aproximadamente 10:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, 10.000:1 o mayor en la unión al antígeno específico frente a la unión inespecífica a otras moléculas irrelevantes. El término “afinidad”, tal como se usa en el presente documento, significa la fuerza de unión de un anticuerpo a un epítopo. La afinidad de un anticuerpo viene dada por la constante de disociación Kd, definida como [Ac] x [Ag]/[Ac-Ag], donde [Ac-Ag] es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, [Ac] es la concentración molar del anticuerpo no unido y [Ag] es la concentración molar del antígeno no unido. La constante de afinidad Ka está definida por 1/Kd. Los métodos preferidos para determinar la afinidad de los AcM pueden encontrarse en Harlow, *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Coligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Müller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983). Un método convencional y preferido bien conocido en la técnica para determinar la afinidad de los AcM es el uso de instrumentos de Biacore.

En particular, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la divulgación, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado (por ejemplo, ratón, cabra, camélido...) a intervalos adecuados (por ejemplo, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes o una vez al mes) con una forma antigénica viral relevante. Por ejemplo, la forma antigénica viral se prepara normalmente según el siguiente método: puede prepararse una cantidad de partículas virales según el sistema de cultivo del ejemplo y luego purificarse sobre almohadilla de iodixanol y finalmente tratarse con una cantidad de tripsina y desoxicolato de sodio (DOCA). Alternativamente, la forma antigénica consiste directamente en un péptido que se deriva del polipéptido de la presente divulgación. Al animal puede administrársele un “refuerzo” final de la forma antigénica en el plazo de una semana del sacrificio. A menudo es deseable usar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribi, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen CpG. En el campo se conocen bien otros adyuvantes adecuados. Los animales pueden inmunizarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras vías. Tras el régimen de inmunización, se aíslan linfocitos del bazo, ganglio linfático u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando un agente tal como polietilenglicol para formar un hibridoma. Tras la fusión, las células se colocan en medios que permiten el crecimiento de los hibridomas, pero no de las parejas de fusión, usando métodos convencionales, tal como se describe (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, Nueva York, 1996). Tras el cultivo de los hibridomas, se analizan los sobrenadantes celulares para determinar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unan selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western. En el campo se conocen bien otras técnicas de análisis. Las técnicas preferidas son aquellas que confirman la unión de anticuerpos a un antígeno conformacionalmente intacto y plegado de forma nativa, tales como ELISA en condiciones no desnaturalizantes, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

En un aspecto adicional, la detección del polipéptido ORF2i u ORF2g de la presente divulgación en una muestra puede ser particularmente interesante con propósitos de diagnóstico. En particular, la detección del polipéptido ORF2i u ORF2g de la presente divulgación es adecuada para determinar la presencia de partículas infecciosas del virus de la hepatitis E en una muestra. Más particularmente, la detección del polipéptido ORF2i u ORF2g de la presente divulgación es adecuada para diagnosticar una infección por virus de la hepatitis E en un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra” incluye cualquier muestra sólida o líquida que pueda contener partículas infecciosas del virus de la hepatitis E. En particular, la muestra se selecciona del grupo que consiste en ascitis; orina; saliva; sudor; leche; líquido sinovial; líquido peritoneal; líquido amniótico; líquido percefalorraquídeo; líquido linfático; embolia pulmonar; líquido cefalorraquídeo; y líquido pericárdico. En particular, la muestra es una muestra de heces. En particular, la muestra es una muestra de orina. En particular, la muestra es una muestra de sangre. Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra de sangre” significa cualquier muestra de sangre derivada del sujeto. Las recogidas de muestras de sangre pueden realizarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, personal médico capacitado puede extraer la sangre del sujeto directamente en anticoagulantes tales como citrato y EDTA. La sangre completa puede separarse en la porción de plasma, las células y la porción de plaquetas mediante centrifugación en condiciones refrigeradas a 3500 X G durante 2 minutos. Después de la centrifugación, el

sobrenadante es el plasma.

La divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y estas figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente divulgación.

Figuras

Figura 1: caracterización de los diferentes productos de ORF2. (A) Detección por WB de proteínas ORF2 en la parte superior y el sedimento del sobrenadante de células PLC3/HEV-p6 purificado sobre almohadilla de iodixanol. (B) Comparación de productos de ORF2 expresados en los lisados celulares y el sobrenadante de células PLC3/HEV-p6, en la fracción infecciosa 6 (F6p6) y la fracción no infecciosa 3 (F3p6) del gradiente de iodixanol, y en el sedimento del sobrenadante de células PLC3/HEV-p6 purificado sobre la almohadilla de iodixanol. (C) El lisado de células PLC3/HEV-p6, el sobrenadante y las partículas de HEV purificadas se desnaturalizaron y digirieron con las glicosidasas indicadas (+) o no (-). La línea a trazos muestra el desplazamiento de migración de las proteínas ORF2 tras el tratamiento con glicosidasa. (D) Detección de proteína ORF2 después de la incubación del sobrenadante de células PLC3/HEV-p6 o PLC3 con perlas de agarosa conjugadas con GNA o proteína A. (E) Las células PLC3/HEV-p6 se trataron (+) o no (-) con brefeldina A (BFA, 16 h, 1 μg/ml) y se analizó la expresión de proteína ORF2 en las células y el sobrenadante. (F) Secuencia de proteínas ORF2 analizada mediante nanoCL-EM/EM. La línea a trazos corresponde al péptido señal. Los recuadros indican los posibles sitios de N-glicosilación. El primer aa de ORF2i y ORF2g identificado mediante marcaje con TMPP-Ac-OSu está en negrita.

Figura 2: caracterización de los diferentes productos de ORF2. Se resolvieron partículas virales purificadas sobre almohadilla de iodixanol y proteínas ORF2g/ORF2c inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-ORF2 (4B2) mediante SDS-PAGE. Se muestran WB y tinción con azul coloidal (CB). La flecha indica ORF2i (A), ORF2g (B) y ORF2c (C). El asterisco indica albúmina humana. H y L indican las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas usadas en IP. Se digirieron las formas de ORF2 en gel con tripsina o AspN y se analizaron mediante nanoCL-EM/EM. La cobertura peptídica se destaca en gris sobre la secuencia de cada producto de ORF2. Las líneas a trazos corresponden a péptidos semi-trípticos y semi-AspN. Leu^{14} y Ser^{34} en negrita corresponden al primer aa de ORF2i (A) y ORF2g (B), respectivamente, que se identificaron mediante escisión semiespecífica y marcaje con TMPP-Ac-OSu. No se hallaron evidencias para la parte N-terminal de ORF2c (C).

Figura 3: las proteínas ORF2g y ORF2c son los principales antígenos de HEV en pacientes infectados. (A) Coinmunoprecipitación con GNA en sueros de pacientes seguido de detección de ORF2. Se usó coinmunoprecipitación del sobrenadante de PLC3/HEV-p6 como control positivo. (B) Fraccionamiento en gradiente de iodixanol (7,5-40 %) del suero de paciente P6 y análisis del contenido de ORF2 de cada fracción mediante WB y coinmunoprecipitación con GNA. (C) Niveles de ARN de HEV en cada fracción medidos mediante RT-qPCR. (D) Detección de Ag de HEV en cada fracción de gradiente usando el kit ELISA^{Plus} de Ag de HEV de Wantaï. Los resultados se expresan como razones de señal con respecto a punto de corte (S/CO).

Figura 4: experimentos de inmunotransferencia de tipo Western que muestran la especificidad de los anticuerpos.

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Productos químicos y cultivos celulares. Se hicieron crecer células PLC/PRF/5 (CRL-8024), PLC1, PLC3 y A549 (CCL-185) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternero fetal inactivado al 10 % (DMEM/FCS) a 37 ºC. Se mantuvieron las células transfectadas a 32 ºC en un medio que contenía DMEM/M199 (1v:1v), 1 mg/ml de albúmina rica en lípidos (Albumax I™) y Na_2SeO_3 40 nM.

Plásmidos y transfección. Los plásmidos que expresan la cepa de gt3 Kernow C-1 adaptada al cultivo celular (HEV-p6, número de registro de GenBank JQ679013) o el replicón que expresa el gen de luciferasa de *Gaussia* (HEV-p6GLuc) fueron proporcionados por S.U Emerson [6]. El replicón con replicación deficiente HEV-p6GLucGAD se generó mutando el motivo GDD en el gen de ARN polimerasa dependiente de ARN [7]. Se generaron transcritos de ARN con extremos ocupados con el kit mMESSAGE mMACHINE® (Ambion). Se suministraron los ARN con extremos ocupados a las células mediante electroporación usando un aparato Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad).

Experimentos cinéticos y producción de virus.

Las células PLC1 y PLC3 se sometieron a electroporación con ARN de HEV-p6 con extremos ocupados (20 μg/4×10^6 células). Para los experimentos cinéticos, cada dos días, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a lisis las células en tampón que contenía TrisHCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40

al 0,5 % (v/v), desoxicolato de sodio al 0,05 %, PMSF 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete; Roche). Para la producción de virus, se dividieron las células cada 10 días. Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80 ºC.

Gradientes de densidad. Se concentró el sobrenadante de PLC3/HEV-p6 con una columna de centrifugación para ultrafiltración Vivaspin (Sartorius). Se dispuso en capas el sobrenadante o suero del paciente concentrado (500 µl) en un gradiente de iodixanol del 7,5-40 %, que se centrifugó a 160.000 g durante 16 h a 4 ºC. Se recogieron doce fracciones de 1 ml y se midió su densidad mediante refractometría. Se determinó el título de ARN de HEV mediante RT-qPCR. Se usó cada fracción para infectar células A549. Se determinó la infectividad mediante inmunofluorescencia indirecta, inmunotransferencia, y titulación viral y de ARN. Para las muestras de pacientes, se usaron fracciones para detección de ORF2, coinmunoprecipitación con GNA, y cuantificación de ARN.

Purificación de partículas infecciosas sobre almohadilla de iodixanol. Se concentró el sobrenadante de PLC3/HEV-p6 mediante centrifugación a través de una almohadilla de iodixanol al 20 % a 160.000 g durante 4 h a 4 ºC. Se resuspendió la almohadilla en PBS, se ultracentrifugó una segunda vez, y se resuspendió el sedimento en PBS.

Infección de ratones humanizados. Se trasplantaron hepatocitos humanos primarios en ratones SCID uPA$^{+/+}$ homocigóticos, tal como se describió previamente [8]. A los ratones humanizados se les inoculó por vía intraesplénica HEV-p6 purificada en gradiente de iodixanol (fracción 6, F6p6, 8,7×10^7 UI/ratón) o el mismo volumen de fracción 6 a partir de un gradiente de control preparado con sobrenadante concentrado de células PLC3 no transfectadas (control de F6). Los ratones no trasplantados a los que se les inocularon estas preparaciones sirvieron como controles negativos. Se usó un ratón quimérico al que se le inoculó una suspensión de heces con gt1 (Sar55, 2,8×10^5 UI/ratón) como control positivo [9]. Se recogieron muestras de heces y plasma semanalmente. Se detectó y cuantificó el ARN viral en plasma y heces de ratón usando RT-qPCR, tal como se describe [9]. La secuenciación de la región S17 se realizó tal como se describe [9].

Microscopía electrónica de transmisión (TEM). A las rejillas de TEM de Formvar-carbono (S162, Oxford Instruments) se inocularon o bien poli-L-lisina al 0,01 % durante 30 min a temperatura ambiente (TA) o bien poli-L-lisina y luego anticuerpos anti-ORF3 (Bioss Antibodies), anti-ORF2 (1E6), o de isotipo coincidente (20 µg/ml) durante 1 h a TA. Se lavaron las rejillas en PBS y se incubaron durante 2 h a TA con muestras virales. Se lavaron las rejillas de TEM en PBS y se incubaron durante 20 min en paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 1 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2. Se tiñeron las partículas atrapadas en las rejillas con acetato de uranilo al 0,5 % antes del examen bajo un TEM JEOL-1230. Para la deslipidación, las partículas o bien se trataron durante 1 h a 37 ºC con ácido desoxicólico sódico al 1 %, tripsina al 0,1 %, luego se procesaron para TEM, o bien se trataron en las mismas condiciones y luego se dispusieron en capas en un gradiente de iodixanol. Después de determinar la densidad y los niveles de ARN, se procesó la fracción 11 para TEM.

Digestiones con glicosidasas. Se desnaturalizaron las muestras de proteínas durante 10 min a 95 ºC en tampón desnaturalizante de glicoproteínas (New England Biolabs). Las digestiones con glicosidasas se llevaron a cabo durante 4 h a 37 ºC en presencia de NP40 al 1 % y el tampón proporcionado por el fabricante (NEB). Como controles se usaron muestras preparadas en las mismas condiciones, pero sin glicosidasa.

Coinmunoprecipitación con GNA. Se incubaron perlas de GNA conjugadas con agarosa durante 2 h a TA con 50-500 µl de suero de paciente o 100 µl de sobrenadante de PLC3/HEV-p6. Se lavaron las perlas 8 veces con NP40 al 0,5 % en PBS. Se eluyeron las proteínas en tampón Laemmli y se analizaron mediante SDS-PAGE. Como control negativo se usaron perlas de agarosa no conjugadas.

Muestras de pacientes. Se recogieron muestras de pacientes en Francia entre 2012 y 2017. Este fue un estudio no intervencionista. Las muestras se obtuvieron únicamente a través del diagnóstico viral convencional siguiendo la orden de un médico (sin muestreo complementario o modificado). Los datos se analizaron anónimamente. La Ley de Salud Pública de Francia (artículo L1121-1.1 del CSP) no requiere consentimiento informado por escrito de los pacientes para un protocolo de este tipo.

Detección de Ag de HEV. Se diluyeron fracciones de gradiente en PBS y se midieron los niveles de Ag con el kit ELISA^{Plus} de Ag de HEV de Wantaï (Wantaï Biological Pharmacy Enterprise) según las instrucciones del fabricante.

Resultados:

Establecimiento de un sistema de cultivo celular de HEV eficiente.

En un intento de establecer un sistema de cultivo celular para HEV, en primer lugar se analizó la replicación de HEV en dos subclones de la línea celular PLC/PRF/5, concretamente células PLC1 y PLC3. Se usó el replicón de HEV gt3 que expresa luciferasa de *Gaussia* (GLuc) denominado HEV-p6GLuc [6], en el que la secuencia

codificante de ORF2 se reemplazó por la secuencia de GLuc secretada. Por tanto, la cantidad de GLuc secretada es proporcional a la síntesis de ARN viral y, en consecuencia, a la replicación de HEV. Las células PLC1, PLC3, y PLC/PRF/5 parentales se sometieron a electroporación con ARN de HEV-p6GLuc o con un genoma de HEV-p6GLuc no replicativo (HEV-p6GLucGAD). Los niveles de replicación de HEV-p6GLuc aumentaron de forma constante con el tiempo en las tres líneas celulares (datos no mostrados), pero las células PLC1 y PLC3 mostraron un mayor aumento en veces de la replicación de HEV, en comparación con las células PLC/PRF/5. Posteriormente se realizaron experimentos usando células PLC1 y PLC3.

Se evaluó la capacidad de las células PLC1 y PLC3 para expresar proteínas virales y producir partículas infecciosas en experimentos cinéticos. Las células PLC1 y PLC3 se sometieron a electroporación con la cepa de ARN HEV-p6 [6]. La inmunofluorescencia con anticuerpos anti-ORF2 y anti-ORF3 mostró que más del 80 % de las células expresaban proteínas virales (datos no mostrados), lo que indica que las células PLC1 y PLC3 son altamente transfectables, y que probablemente se produce una replicación y una expresión robustas del genoma viral en estas células. Debe observarse que la expresión de ORF2 se inhibió en presencia de sofosbuvir (SFV) (datos no mostrados), confirmando la especificidad de la señal.

A continuación, se analizó la expresión de las proteínas ORF2 y ORF3 en los lisados celulares y los sobrenadantes de células PLC1 y PLC3 sometidas a electroporación con HEV-p6 mediante inmunotransferencia de tipo Western (WB) en diferentes puntos de tiempo. De manera importante, la proteína ORF2 se detectó en los lisados celulares y el sobrenadante de células PLC1 tan pronto como 2 y 4 días después de la electroporación (p.e.), respectivamente (datos no mostrados). En células PLC3 sometidas a electroporación con HEV-p6, la expresión de la proteína ORF2 se retrasó ligeramente. Debe observarse que las células PLC3 crecen más lentamente que las células PLC1, lo que podría explicar las diferencias observadas. Además del producto principal de ORF2, también se detectaron proteínas relacionadas con ORF2 con pesos moleculares más bajos en células y sobrenadantes, lo que indica que la proteína de la cápside ORF2 probablemente experimenta modificaciones postraduccionales. La proteína ORF3 también se detectó tempranamente 2 y 4 días p.e. en lisados celulares de PLC1 y PLC3, respectivamente (datos no mostrados). En cambio, la proteína ORF3 se detectó débilmente en los sobrenadantes de células sometidas a electroporación, lo que indica que esta proteína se expresa principalmente de manera intracelular.

El producto principal de ORF2 en el sobrenadante (datos no mostrados) presentaba un peso molecular aparente mayor que la forma intracelular (datos no mostrados), lo que sugiere que la proteína ORF2 de alta secreción probablemente experimenta modificaciones postraduccionales. La comparación de las proteínas ORF3 intracelulares y extracelulares mostró que la proteína ORF3 secretada migraba ligeramente más rápido que la proteína intracelular (datos no mostrados), probablemente reflejando diferencias en la fosforilación de proteínas [10] o modificaciones no descritas de la proteína ORF3.

También se monitorizaron el ARN viral y las partículas infecciosas en los sobrenadantes de células transfectadas recogidas en diferentes días p.e. Los niveles de ARN de HEV se evaluaron mediante RT-qPCR. Se detectaron niveles altos de ARN tan pronto como 2 días p.e. (datos no mostrados). Los títulos de ARN aumentaron progresivamente y alcanzaron $1{,}1\times10^{8}$ y $3{,}3\times10^{7}$ copias/ml en el día 10 para células PLC1 y PLC3, respectivamente (datos no mostrados). En paralelo, se determinaron los títulos virales infecciosos y alcanzaron 7×10^{3} y $1{,}5\times10^{3}$ uff/ml para células PLC1 y PLC3, respectivamente. Estos resultados indican que el ensamblaje de partículas virales infecciosas se produce muy temprano e igualmente en células PLC1 y PLC3 sometidas a electroporación con HEV-p6. Sin embargo, la infectividad de HEV representa $1{,}5\times10^{4}$ copias de ARN/uff para células PLC1 y $2{,}2\times10^{4}$ copias de ARN/uff para células PLC3, lo que indica que el ensamblaje de partículas de HEV infecciosas es probablemente un proceso ineficiente. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que un inhibidor viral o celular bloquee la infección por HEV y sesgue los títulos infecciosos. Se llevaron a cabo experimentos adicionales usando células PLC3.

La proteína de la cápside ORF2 se produce masivamente, pero sólo se ensambla una pequeña fracción en las partículas infecciosas.

Para producir grandes cantidades de sobrenadantes infecciosos, se cultivaron células PLC3 transfectadas con HEV-p6 durante 47 días. Los sobrenadantes se agruparon, se concentraron, y se fraccionaron en un gradiente de iodixanol. Se analizó la distribución de proteína ORF2, proteína ORF3, ARN y partículas virales infecciosas a partir de cada fracción (datos no mostrados). La proteína ORF2 se detectó a partir de las fracciones 2 a 7 pero más abundantemente en las fracciones 3 a 5 (datos no mostrados). Tal como se observa en los sobrenadantes de células transfectadas (figura 1C), la proteína ORF2 en las fracciones 2 a 5 se detectó como dos productos, un producto principal de aproximadamente 90 kDa (ORF2g) y un producto más pequeño de aproximadamente 75 kDa (ORF2c). También se detectaron proteínas relacionadas con ORF2 con pesos moleculares más bajos en la parte superior del gradiente en las fracciones 2 a 5, que podrían corresponder a formas procesadas adicionales de las proteínas. En cambio, la proteína ORF2 se detectó principalmente como un producto de 80 kDa (ORF2i) en las fracciones 6 y 7, que corresponde al tamaño de ORF2 intracelular (figura 1C). La proteína ORF3 se detectó exclusivamente en las fracciones 5 a 7, pero más abundantemente en la fracción 6 (datos no mostrados). Curiosamente, sólo se detectó un pico principal de ARN en la fracción 6, con una densidad de

1,10 g/ml (datos no mostrados). Por tanto, una gran cantidad de proteína de la cápside (fracciones 2 a 4) no estaba asociada al ARN viral, mientras que la proteína ORF3 sí lo estaba.

La infectividad de cada fracción se analizó infectando células A549. La expresión de las proteínas ORF2 y ORF3 se analizó mediante WB (datos no mostrados) e inmunofluorescencia indirecta (datos no mostrados) cinco días después de la infección. Las proteínas ORF2i y ORF3 se detectaron en los lisados de células infectadas con las fracciones 5, 6 y 7 (datos no mostrados), lo que sugiere que las partículas infecciosas estaban asociadas a estas fracciones. De hecho, la tinción de inmunofluorescencia de células A549 a las que se les inocularon las fracciones 5, 6 y 7 fueron positivas para la expresión de la proteína ORF2, mientras que las células a las que se les inocularon las fracciones 1 a 4 y las fracciones 8 a 12 fueron negativas (datos no mostrados). La fracción 6 mostró el título infeccioso más alto (5×10^6 uff/ml). Mientras que las proteínas ORF2g y ORF2c se detectaron en células a las que se les inocularon las fracciones 3 y 4 (datos no mostrados), no se observó ninguna infección específica con estas fracciones mediante inmunofluorescencia (datos no mostrados), lo que indica que ORF2g y ORF2c son probablemente proteínas muy estables que se unen a la superficie celular que pueden detectarse después de varios días de incubación.

Debe observarse que la tetraspanina CD81 exosómica se detectó en fracciones infecciosas (datos no mostrados), apoyando la hipótesis de que las partículas de HEV probablemente aprovechan la ruta secretora exosómica para su salida [11].

En conjunto, los resultados de los presentes inventores indican que, durante el ciclo de vida del HEV, la proteína de la cápside ORF2 se produce masivamente, pero sólo una pequeña fracción (ORF2i) se ensambla en partículas infecciosas que se secretan a través de la ruta exosómica.

Infección de ratones quiméricos con hígado humano con partículas de HEVcc.

Recientemente, se han descrito ratones quiméricos con hígado humano como valiosos modelos para estudiar *in vivo* la infección por HEV crónica y evaluar moléculas antivirales [9,12-14]. El establecimiento de la infección por HEV en ratones quiméricos se logró después de la inoculación de viriones gt1 o gt3. Sin embargo, la inoculación de partículas derivadas de sobrenadante de cultivo celular no tratado a ratones no dio como resultado una infección robusta. Por tanto, a continuación se evaluó si las presentes partículas de HEVcc eran capaces de infectar ratones trasplantados con hepatocitos humanos primarios (PHH) [9]. A los ratones quiméricos se les inoculó por vía intraesplénica o bien la fracción 6 de HEV-p6 (F6p6) purificada en gradiente de iodixanol (figura 2) o bien la fracción 6 de un gradiente de control preparado a partir de sobrenadante de células PLC3 no transfectadas (control de F6, neg. 1) (datos no mostrados). Se usó un ratón quimérico humano al que se le inoculó una suspensión de heces de gt1 (Sar55) como control positivo [9]. Se usó un ratón no trasplantado al que se le inoculó F6p6 como segundo control negativo (neg. 2). Aunque, en menor grado que el ratón infectado con gt1, el ratón quimérico al que se le inoculó F6p6 todavía mostraba signos de infección activa (datos no mostrados). De hecho, se detectó ARN de HEV en heces de ratón quimérico al que se le inoculó F6p6 desde la semana 2 a 10 con un aumento significativo desde la semana 8 a 10 (datos no mostrados). También se detectó ARN de HEV genómico en contenido de intestino delgado (datos no mostrados) e hígado de ratón (datos no mostrados). La carga de ARN en el ratón al que se le inoculó F6p6 aumentó más lentamente en comparación con el ratón al que se le inoculó gt1, tal como se describió previamente [9], pero por primera vez se demuestra una infección robusta de un ratón quimérico al que se le inoculó partículas de HEV derivadas del sobrenadante de cultivo celular.

Dado que la cepa de HEV-p6 contiene el fragmento de proteína ribosómica S17 humana que confiere una ventaja de crecimiento [6,15], a continuación se secuenció esta región de HEV-p6 del ratón infectado con F6p6 (heces de la semana 9 p.i. y un trozo de hígado) y se comparó con el inóculo. No se encontró ninguna reversión de mutaciones adaptativas en la región S17 (datos no mostrados).

Ultraestructura de partículas de HEV.

Recientemente, una nueva estrategia basada en la inmunocaptura (IC) específica directa de partículas del virus de la hepatitis C (HCV) en rejillas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) condujo, por primera vez, a la descripción precisa de su ultraestructura [16]. Para definir la morfología de las partículas de HEVcc, que nunca se ha descrito con precisión, se usó el mismo enfoque sobre partículas infecciosas aisladas. En primer lugar, se analizó el material capturado en rejillas recubiertas con poli-L-lisina, un factor de unión policatiónico. Se observó una población bastante homogénea de partículas de 40-70 nm de tamaño (datos no mostrados). A continuación, se realizó IC con un anticuerpo específico para la proteína ORF3 que se había descrito como expuesto en partículas de HEV asociadas a lípidos. Se observaron partículas con una subestructura icosaédrica interna aparente que probablemente corresponde a la cápside (datos no mostrados). El cálculo de la distribución de tamaños mostró que los tamaños de partícula oscilaban entre 40 nm y 70 nm. En cambio, no se observaron partículas cuando se usaron anticuerpos anti-ORF2 (1E6) (datos no mostrados) o de control de isotipo (datos no mostrados). Sin embargo, cuando la preparación viral se sometió en primer lugar a deslipidación parcial mediante tratamiento con desoxicolato sódico y tripsina (DT) antes de la IC con el anticuerpo anti-ORF2, se

inmunocapturaron dos poblaciones de partículas: una población principal que consistía en partículas de 30-50 nm de tamaño y una población más heterogénea con partículas de 90-140 nm (datos no mostrados). Por tanto, el tratamiento con DT desenmascaraba el epítopo 1E6 en partículas virales y conducía a la IC de partículas de HEV pequeñas que probablemente corresponden a viriones desnudos. Sin embargo, el tratamiento con DT no eliminó completamente ORF3 ni los lípidos asociados, ya que algunas partículas todavía eran capturadas por un anticuerpo anti-ORF3 (datos no mostrados). El mayor tamaño de estas partículas se debe probablemente a la disociación de sus recubrimientos lipídicos. En cambio, cuando las partículas tratadas con DT se purificaron en gradiente de densidad antes de la IC (datos no mostrados), se inmunocapturó una población altamente homogénea de partículas de aproximadamente 32 nm con 1E6, mientras que no se capturaron partículas por IC con anticuerpo anti-ORF3. Estas partículas, con una densidad de 1,18 g/ml, presentaban una estructura icosaédrica que probablemente corresponde a las cápsides desnudas.

A continuación se analizó la ultraestructura de partículas auténticas procedentes de tres sueros de pacientes infectados con HEV (HEVser). En cuanto a HEVcc, no se observaron partículas por IC con anticuerpo anti-ORF2 o IC con anticuerpos irrelevantes (datos no mostrados). En cambio, IC con anticuerpo anti-ORF3 dio como resultado el aislamiento eficiente de poblaciones pleomórficas. Las partículas de HEVser1 y HEVserST-1 tenían una morfología similar a las partículas de HEVcc, mientras que las partículas de HEVser2 presentaban una capa externa gruesa que probablemente corresponde a los lípidos (datos no mostrados). El cálculo de la distribución de tamaños de las partículas inmunocapturadas mostró que los diámetros medios y las medianas del diámetro de las partículas de HEVser eran generalmente mayores que los de las partículas de HEVcc y diferían entre pacientes (datos no mostrados). Las partículas de HEVser2 eran las más grandes con un diámetro medio de 120 nm. Estos resultados indican que el contenido de lípidos de las partículas probablemente determina el tamaño de partícula, tal como se describe para las partículas de HCV [16].

Finalmente, se analizó la ultraestructura de partículas procedentes de heces de pacientes infectados con HEV, tal como se describió anteriormente. A diferencia de HEVcc y HEVser, las partículas de heces fueron capturadas por IC con anticuerpo anti-ORF2, mientras que no se capturaron partículas por IC con anticuerpo anti-ORF3 (datos no mostrados). Aunque las partículas parecían estar enmarañadas en impurezas que limitaban el cálculo de la distribución de tamaños, el diámetro medio de las partículas de heces de HEV fue de 28 nm (n=34, media=28 nm, mediana=28 nm, DE=4 nm), lo que concuerda con observaciones previas [17]. En cuanto a HEVcc sometidas a deslipidación, las partículas de heces presentaron una estructura icosaédrica que probablemente corresponde a las cápsides desnudas.

Caracterización de las diferentes formas de la proteína ORF2.

Se desarrolló un sistema de purificación que usa una almohadilla de iodixanol al 20 % para separar fácilmente las partículas infecciosas (ORF2i, figura 1A, sedimento) a partir de las proteínas ORF2g/ORF2c que no están asociadas a partículas infecciosas (figura 1A, parte superior).

HEV produce grandes cantidades de proteínas ORF2g/ORF2c secretadas que son probablemente formas glicosiladas/procesadas de la proteína ORF2. En cambio, la proteína ORF2 asociada a partículas infecciosas (ORF2i) purificada por gradiente (F6p6) o almohadilla (sedimento/almohadilla) de iodixanol presentó el mismo tamaño que la proteína ORF2 intracelular (células) (figura 1B), lo que indica que ORF2i probablemente no experimenta modificaciones postraduccionales.

Dado que la secuencia de la proteína ORF2 contiene tres posibles sitios para la glicosilación ligada a N y múltiples sitios para la glicosilación ligada a O, a continuación se analizó la sensibilidad de las proteínas ORF2 al tratamiento con diferentes glicosidasas (figura 1C). La endoglicosidasa H (EndoH) realiza la escisión dentro del núcleo de quitobiosa de oligosacáridos de alto contenido en manosa y algo híbridos procedentes de N-glicoproteínas. La péptido-N-glicosidasa F (PNGasaF) realiza la escisión entre los residuos de N-acetilglucosamina y asparagina más internos de oligosacáridos de alto contenido en manosa, híbridos y complejos procedentes de N-glicoproteínas. La O-glicosidasa (O-Gly) cataliza la eliminación de algunos disacáridos unidos a O. La neuraminidasa (Neura) cataliza la hidrólisis de residuos de ácido siálico procedentes de N-glicoproteínas y O-glicoproteínas. Debe observarse que los ácidos siálicos terminales bloquean la acción de O-Gly. La proteína ORF2i expresada a partir de lisados celulares o partículas de HEV purificadas era resistente a digestiones con glicosidasas (figura 1C), lo que indica que esta proteína no está N-glicosilada ni O-glicosilada. En cambio, las proteínas ORF2g/ORF2c secretadas eran sensibles a la digestión con glicosidasas EndoH y PNGasaF, tal como se comprobó por el desplazamiento de movilidad tras el tratamiento, lo que indica que estas proteínas son N-glicoproteínas. Las proteínas ORF2g/ORF2c eran resistentes al tratamiento con O-Gly, pero sensibles al tratamiento con Neura y más notablemente a una combinación de Neura y O-Gly. Estos resultados indican que las proteínas ORF2g/ORF2c son proteínas sialiladas y O-glicosiladas. De manera importante, las proteínas ORF2g/ORF2c precipitaron mediante una coinmunoprecipitación con aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), una lectina que interactúa con glicanos del tipo alto contenido en manosa, lo que confirma la naturaleza oligomanosídica de los N-glicanos ORF2g/ORF2c (figura 1D) y permite la precipitación fácil y específica de las proteínas ORF2g/ORF2c.

Se demostró que ORF2g/ORF2c secretadas son proteínas glicosiladas, lo que indica que estas proteínas pasan a través de la ruta secretora. Sin embargo, las proteínas ORF2g/ORF2c no se detectaron a nivel intracelular. Por tanto, se planteó la hipótesis de que las proteínas ORF2g/ORF2c podrían moverse rápidamente a través de la ruta secretora y secretarse rápidamente sin acumulación intracelular. Se trataron así células PLC3 que expresan HEV-p6 con brefeldina A (BFA), un inhibidor de la secreción de proteínas [18] (figura 1E). Tras el tratamiento con BFA, se bloqueó la secreción de proteínas ORF2g/ORF2c. Curiosamente, se detectaron una banda difusa que probablemente corresponde a ORF2g y una banda débil que probablemente corresponde a ORF2c en el lisado de células tratadas con BFA, lo que indica que, tras el bloqueo de la secreción de proteínas, las proteínas ORF2g/ORF2c se acumulan en la célula, validando así la presente hipótesis.

A continuación, se analizó la secuencia de proteínas ORF2 mediante espectrometría de masas. Las partículas virales purificadas sobre almohadilla de iodixanol y las proteínas ORF2g/ORF2c inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-ORF2 (4B2) se resolvieron mediante SDS-PAGE. Las bandas teñidas con azul coloidal correspondientes a ORF2i, ORF2g y ORF2c en WB (figura 2) se digirieron en gel con tripsina o AspN y luego se analizaron mediante nanoCL-EM/EM. Los péptidos identificados y la cobertura de la secuencia se muestran en la figura 2. Para las tres proteínas, el extremo C-terminal estaba completamente cubierto, demostrando la ausencia de procesamiento en sus extremos C-terminales. Para la proteína ORF2i, se identificó inesperadamente un péptido semi-tríptico que cubría la mitad del péptido señal (SP) (figura 2A, línea a trazos), sugiriendo que el SP de ORF2i podría no escindirse. Para ORF2g, se identificaron péptidos trípticos y semi-AspN que comienzan con Ser^{34}, lo que sugiere que el primer aa de la proteína ORF2g podría corresponder a Ser^{34} (figura 2B). Para ORF2c, se identificaron péptidos trípticos que comienzan con Iso^{234}, lo que sugiere que el primer aa de la proteína ORF2c podría corresponder a uno de los aa en proximidad a Iso^{234} (figura 2C). Dado que los péptidos semi-trípticos y semi-AspN corresponden a procesamiento de proteínas naturales o eventos proteolíticos inespecíficos durante el análisis proteómico, se realizó además marcaje con bromuro de N-succinimidiloxicarbonilmetil-tris(2,4,6-trimetoxifenil)fosfonio (TMPP-Ac-OSu), que se une específicamente al extremo N-terminal de proteínas intactas [19]. Los péptidos identificados con la modificación TMPP-Ac-OSu confirmaron que los primeros aa de ORF2i y ORF2g corresponden a Leu^{14} y Ser^{34}, respectivamente (figuras 1F, 2). En cambio, como el marcaje con TMPP-Ac-OSu no identificó el primer aa de ORF2c, son necesarios estudios adicionales para aclarar esta observación. En conjunto, estos datos indican que la proteína ORF2g pierde su SP y probablemente se procesa por proteasas de la ruta secretora. En cambio, la proteína ORF2i no se procesa por una peptidasa señal y, por tanto, probablemente no se transloca a la luz del RE.

Las proteínas ORF2g/ORF2c son los principales antígenos en sueros de pacientes infectados con HEV

Dado que se demostró que, en cultivo celular, HEV produce principalmente formas glicosiladas de proteínas ORF2 que no están asociadas a partículas infecciosas, a continuación se buscó determinar si ocurre lo mismo en pacientes infectados. Se precipitaron sueros de 17 pacientes infectados con HEV y de cinco pacientes negativos para HEV mediante coinmunoprecipitación con GNA y se realizó detección en busca de la proteína ORF2 (figura 3A), tal como se describió anteriormente. Se usó coinmunoprecipitación con GNA del sobrenadante de PLC3/HEV-p6 como control positivo. Sorprendentemente, 13 y 7 de los 17 sueros positivos para HEV presentaron grandes cantidades de las proteínas ORF2g y ORF2c, respectivamente. Las proteínas ORF2 no se detectaron en sueros negativos para HEV. Además, la detección de las proteínas ORF2g/ORF2c no dependía ni de la cepa de HEV del paciente ni de la carga viral sérica (tabla 1). De manera importante, el fraccionamiento de suero de un paciente (paciente P6) en un gradiente de iodixanol seguido de coinmunoprecipitación con GNA de cada fracción (figura 3B) demostró que, como en el cultivo celular, se aislaron cantidades muy grandes de proteínas ORF2g/ORF2c en fracciones ligeras (fracciones 4 y 5) y coinmunoprecipitaron mediante GNA. Sin embargo, estas fracciones no estaban asociadas a material infeccioso, ya que no estaban asociadas al genoma viral (figura 3C). Debe observarse que las proteínas ORF2 presentes en la fracción 4 probablemente no precipitaron mediante perlas de GNA debido a la presencia de altas cantidades de albúmina humana. Los presentes resultados indican que las proteínas ORF2g/ORF2c son probablemente los principales antígenos en sueros de pacientes infectados con HEV. Por tanto, se cuantificaron las proteínas ORF2 en cada fracción del gradiente con el ensayo $ELISA^{Plus}$ de antígeno de HEV de Wantaï (figura 3D). Curiosamente, la mayor cantidad de antígeno se detectó en la fracción 4, que contenía las proteínas ORF2g/ORF2c, mientras que se detectaron cantidades más bajas de antígenos en las demás fracciones y, en particular, en la fracción 7, la fracción infecciosa. En conjunto, los presentes resultados indican que, en pacientes infectados, HEV produce altas cantidades de proteína antigénica glicosilada que no están asociadas a partículas infecciosas y pueden conducir a un sesgo en el diagnóstico de la infección por HEV activa.

Tabla 1: Características de los sueros de pacientes con HEV usados en la coinmunoprecipitación con GNA

Pacientes	Genotipo	Título sérico [a]	Cantidad usada en la coinmunoprecipitación con GNA [b]	Niveles de Ag [c]	Proteínas ORF2 [d]
P1	3c	$1{,}3\times10^{8}$	$6{,}5\times10^{6}$	17,4	ORF2g
P2	3c	$3{,}7\times10^{7}$	$1{,}8\times10^{6}$	19,4	ORF2g

P3	3c	$2,1\times10^{7}$	$2,1\times10^{6}$	17,4	ORF2g
P4	ND	$2,0\times10^{5}$	$1,0\times10^{5}$	20,2	ORF2g/ORF2c
P5	3f	$7,0\times10^{5}$	$3,5\times10^{5}$	ND	-
P6	3c	$1,6\times10^{8}$	$1,6\times10^{7}$	19,4	ORF2g/ORF2c
P7	3c	$1,2\times10^{7}$	$1,2\times10^{6}$	18,6	ORF2g/ORF2c
P8	3f	$1,2\times10^{5}$	$0,6\times10^{5}$	5	-
P9	3f	$1,5\times10^{5}$	$0,7\times10^{5}$	19,7	ORF2g/ORF2c
P10	3f	$1,2\times10^{6}$	$0,6\times10^{6}$	18,9	ORF2g/ORF2c
P11	ND	ND	ND	18,3	ORF2g/ORF2c
P12	3f	$2,0\times10^{6}$	$1,0\times10^{6}$	ND	ORF2g
P13	3f	$2,1\times10^{6}$	$1,0\times10^{6}$	ND	ORF2g
P14	3e	$1,0\times10^{6}$	$2,0\times10^{5}$	ND	-
P15	3	$1,1\times10^{6}$	$2,0\times10^{5}$	ND	-
P16	3c	ND	ND	ND	ORF2g
P17	3c	ND	ND	ND	ORF2g/ORF2c

[a] en copias de ARN de HEV/ml

[b] en copias de ARN de HEV

[c] en valores de S/CO. Las muestras se diluyeron 100 veces en PBS y se cuantificaron con el kit de ELISA de Ag de HEV de Wantaï.

[d] detectadas en la coinmunoprecipitación con GNA + WB con anticuerpo anti-ORF2

Discusión:

Combinando la cepa p6 altamente replicativa y adaptada al cultivo celular [6] y subclones altamente transfectables de células PLC/PRF/5, se desarrolló un nuevo sistema de cultivo celular para el cual la replicación viral y la expresión de proteínas se detectaron muy temprano después de la transfección. Los experimentos de evolución temporal mostraron que la proteína ORF2 se secretaba de manera temprana y masiva en el sobrenadante de células transfectadas, tal como se informó recientemente [20,21]. Curiosamente, las proteínas ORF2 y ORF3 migraron de manera diferente cuando se detectaron en el lisado celular o en el sobrenadante, lo que indica que estas proteínas probablemente experimentan modificaciones postraduccionales durante su secreción. Serían necesarios experimentos adicionales para identificar tales modificaciones en la proteína ORF3. La proteína ORF2 contiene tres posibles sitios para la glicosilación ligada a N y múltiples sitios para la glicosilación ligada a O. Usando vectores de expresión, se ha demostrado previamente que la proteína ORF2 está glicosilada y se expresa en la superficie celular [22-24], pero no está claro si la proteína ORF2 glicosilada es la forma natural del virión. Recientemente, se ha sugerido que la cápside del virión de HEV está probablemente glicosilada [20], aunque Graff *et al.* demostraron lo contrario [25]. El presente estudio reveló que HEV produce grandes cantidades de proteínas ORF2, denominadas ORF2g y ORF2c, que son secretadas, sialiladas, N-glicosiladas y O-glicosiladas, pero no están asociadas a viriones infecciosos. Una gran parte de las proteínas ORF2 probablemente se transloca en la luz del RE donde se someten a N-glicosilación y probablemente procesamiento por proteasas para generar proteínas ORF2g y ORF2c. Estas dos proteínas se mueven rápidamente a través de la ruta secretora donde se someten a O-glicosilación y sialilación, y luego se secretan rápidamente. Curiosamente, la presencia de residuos RGRR en el sentido de 5' del extremo N-terminal de ORF2g sugiere que una proteasa similar a furina podría estar implicada en su maduración. Serían necesarios experimentos adicionales para caracterizar los sitios de glicosilación y procesamiento en la secuencia de ORF2, notablemente el mecanismo que conduce a la producción de la proteína ORF2c. En cambio, la proteína ORF2i observada a nivel intracelular y en viriones probablemente no se transloca a la luz del RE y permanece en el compartimento citosólico. Los presentes resultados sugieren la existencia de dos rutas de producción para la proteína de la cápside del HEV: (i) una ruta no productiva principal en la que las proteínas ORF2 se suministran a la ruta de secreción donde se procesan y secretan rápidamente y (ii) una ruta productiva en la que las proteínas ORF2 citosólicas se suministran a los sitios de ensamblaje del virión. Son necesarios estudios adicionales para investigar a fondo estas rutas.

A diferencia de los estudios previos [9,13], se logró infectar ratones quiméricos con partículas de HEVcc gt3. La separación de partículas infecciosas procedentes de proteínas ORF2g/ORF2c por gradiente de densidad podría explicar el presente éxito, ya que estas proteínas interfieren con la capacidad de los viriones para infectar células diana, usando un mecanismo que necesita ser dilucidado.

Se encontró que, durante su ciclo de vida, HEV secreta altamente formas glicosiladas de la proteína ORF2, que circulan en pacientes infectados y son los principales antígenos en sueros de pacientes. Sería interesante definir qué forma de proteína ORF2 es reconocida por anticuerpos de pacientes que han resuelto sus infecciones. HEV puede producir proteínas ORF2g/ORF2c como cebo inmunológico. Curiosamente, usando análisis por TEM, se encontró que las proteínas ORF2g/ORF2c no forman material particulado (datos no mostrados), a diferencia de otros virus, tales como el virus de la hepatitis B, donde el antígeno de superficie forma partículas subvirales.

Los presentes análisis por TEM mostraron que HEVcc son partículas de 40-70 nm de tamaño que presentan estructuras internas y la proteína ORF3 en su superficie. El tratamiento con DT y la ultracentrifugación desvelaron pequeñas cápsides icosaédricas similares a las encontradas en heces de pacientes ([17] y el presente estudio), lo que indica que las HEVcc están asociadas a los lípidos en los que está incorporada ORF3. Los presentes análisis demostraron que, aunque mucho más grandes, las partículas de HEVser tienen una morfología similar a la de las partículas de HEVcc. Los viriones de HEVser presentan la proteína ORF3 en su superficie y probablemente están asociados en gran medida a los lípidos. Como los diámetros de HEVser diferían entre pacientes, sería interesante determinar si las variaciones de tamaño observadas están relacionadas con el contenido de lípidos, tal como se demostró recientemente para las partículas de HCV [16].

Recientemente, el ensayo ELISA de Ag de HEV de Wantaï se comercializó para diagnosticar la infección por HEV. Los estudios comparativos de este ensayo mostraron altos niveles de especificidad y sensibilidad [26-29]. Sin embargo, se encontraron algunas discrepancias entre la detección de antígenos y la cuantificación de ARN en algunas muestras en las que se detectó el antígeno de HEV en ausencia de ARN detectable [27-29]. En manos de los presentes inventores, el ensayo de antígeno también fue muy sensible. Sin embargo, se halló que las proteínas ORF2g/ORF2c, que no están asociadas a viriones infecciosos, eran los principales antígenos reconocidos por el kit. En conjunto, estos datos indican que los resultados obtenidos con el ensayo ELISA de Ag de HEV deben interpretarse cuidadosamente. De hecho, este ensayo podría no detectar necesariamente una infección activa, ya que las proteínas ORF2g/ORF2c parecen ser muy estables en cultivo celular, pero probablemente también en sueros de pacientes [28], lo que sugiere que estas proteínas podrían permanecer en sueros de pacientes incluso cuando HEV ya no se replica en el hígado.

EJEMPLO 2

Generación de anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína ORF2i. Se sintetizó un péptido (P1) que deriva del polipéptido de la presente invención (ORF2i) y se acopló a KLH. Se inmunizaron cinco ratones tres veces a intervalos de tres semanas con el péptido P1. Se usaron adyuvantes completos e incompletos de Freund durante la inmunización. Los animales se inmunizaron por vías subcutánea e intraperitoneal. Diez días después de la tercera inmunización, se tomaron muestras de sangre de los ratones y se sometieron a prueba sus sueros para determinar la inmunorreactividad. Los sueros se sometieron a ensayo en primer lugar mediante ELISA indirecto en placas recubiertas con el péptido P1 (datos no mostrados). A continuación se analizó su especificidad en experimentos de inmunotransferencia de tipo Western con una mezcla de proteínas ORF2 (ORF2i y ORF2g/ORF2c) como antígenos (figura 4). Dos (P1S2 y P1S5) de los cinco sueros mostraron un reconocimiento altamente específico de la proteína ORF2i, sin reacción cruzada con las proteínas ORF2g/c, en comparación con el anticuerpo 1E6 que reconoce las tres formas (figura 4). Está llevándose a cabo la clonación y producción de anticuerpos monoclonales.

Estos resultados indican que pueden producirse anticuerpos dirigidos específicamente contra el polipéptido ORF2i. Tales anticuerpos serán muy adecuados para determinar la presencia de partículas infecciosas del virus de la hepatitis E en una muestra. Más particularmente, la detección del polipéptido ORF2i u ORF2g de la presente invención es adecuada para diagnosticar una infección por virus de la hepatitis E en un sujeto.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta divulgación.

1. Debing Y, Moradpour D, Neyts J, *et al*. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. Journal of Hepatology 2016;65:200-212.

2. Pischke S, Hartl J, Pas SD, *et al*. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? Journal of Hepatology 2017;66:1082-1095.

3. Khuroo MS, Khuroo MS. Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure. Journal of Viral Hepatitis 2016;23:68-79.

4. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, *et al*. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature 2013;496:367-371.

5. Okamoto H. Culture systems for hepatitis E virus. J Gastroenterol 2012;48:147-158.

6. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, *et al*. Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. J Virol 2012;86:5697-5707.

7. Emerson SU, Nguyen H, Graff J, *et al*. *In vitro* replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. J Virol 2004;78:4838-4846.

8. Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, *et al*. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. Hepatology 2005;41:847-856.

9. Sayed IM, Verhoye L, Cocquerel L, *et al*. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. Gut 2017;66:920-929.

10. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, *et al*. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. J Virol 1997;71:9045-9053.

11. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, *et al*. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. Journal of General Virology 2014;95:2166-2175.

12. Allweiss L, Gass S, Giersch K, *et al*. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. Journal of Hepatology 2016;64:1033-1040.

13. van de Garde MDB, Pas SD, van der Net G, *et al*. Hepatitis E Virus (HEV) Genotype 3 Infection of Human Liver Chimeric Mice as a Model for Chronic HEV Infection. J Virol 2016;90:4394-4401.

14. Sayed IM, Foquet L, Verhoye L, *et al*. Antiviral Research. Antiviral Research 2017;141:150-154.

15. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, *et al*. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011;108:2438-2443.

16. Piver E, Boyer A, Gaillard J, *et al*. Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. Gut 2016.

17. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, *et al*. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology 1983;20:23-31.

18. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. J Cell Biol 1992;116:1071-1080.

19. Gallien S, Perrodou E, Carapito C, *et al*. Ortho-proteogenomics: Multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol. Genome Research 2008;19:128-135.

20. Qi Y, Zhang F, Zhang L, *et al*. Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. PLoS ONE 2015;10:e0132503.

21. Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, *et al*. Establishment of hepatitis E virus infection-permissive and -non-permissive human hepatoma PLC/PRF/5 subclones. Microbiol. Immunol. 2015;59:89-94.

22. Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, *et al*. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. J Virol 1996;70:207-216.

23. Torresi J, Meanger J, Lambert P, *et al*. High level expression of the capsid protein of hepatitis E virus in diverse eukaryotic cells using the Semliki Forest virus replicon. J. Virol. Methods 1997;69:81-91.

24. Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, *et al*. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. J Virol 1999;73:4074-4082.

25. Graff J, Zhou Y-H, Torian U, *et al*. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. J Virol 2008;82:1185-1194.

26. Trémeaux P, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, *et al*. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. J. Clin. Virol. 2016;79:1-5.

27. Zhao C, Geng Y, Harrison TJ, *et al*. Evaluation of an antigen-capture EIA for the diagnosis of hepatitis E virus

infection. Journal of Viral Hepatitis 2015;22:957-963.

28. Behrendt P, Bremer B, Todt D, *et al*. Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection. Journal of Infectious Diseases 2016;214:361-368.

29. Geng Y, Zhao C, Huang W, *et al*. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. Journal of Hepatology 2016;64:37-43.

REIVINDICACIONES

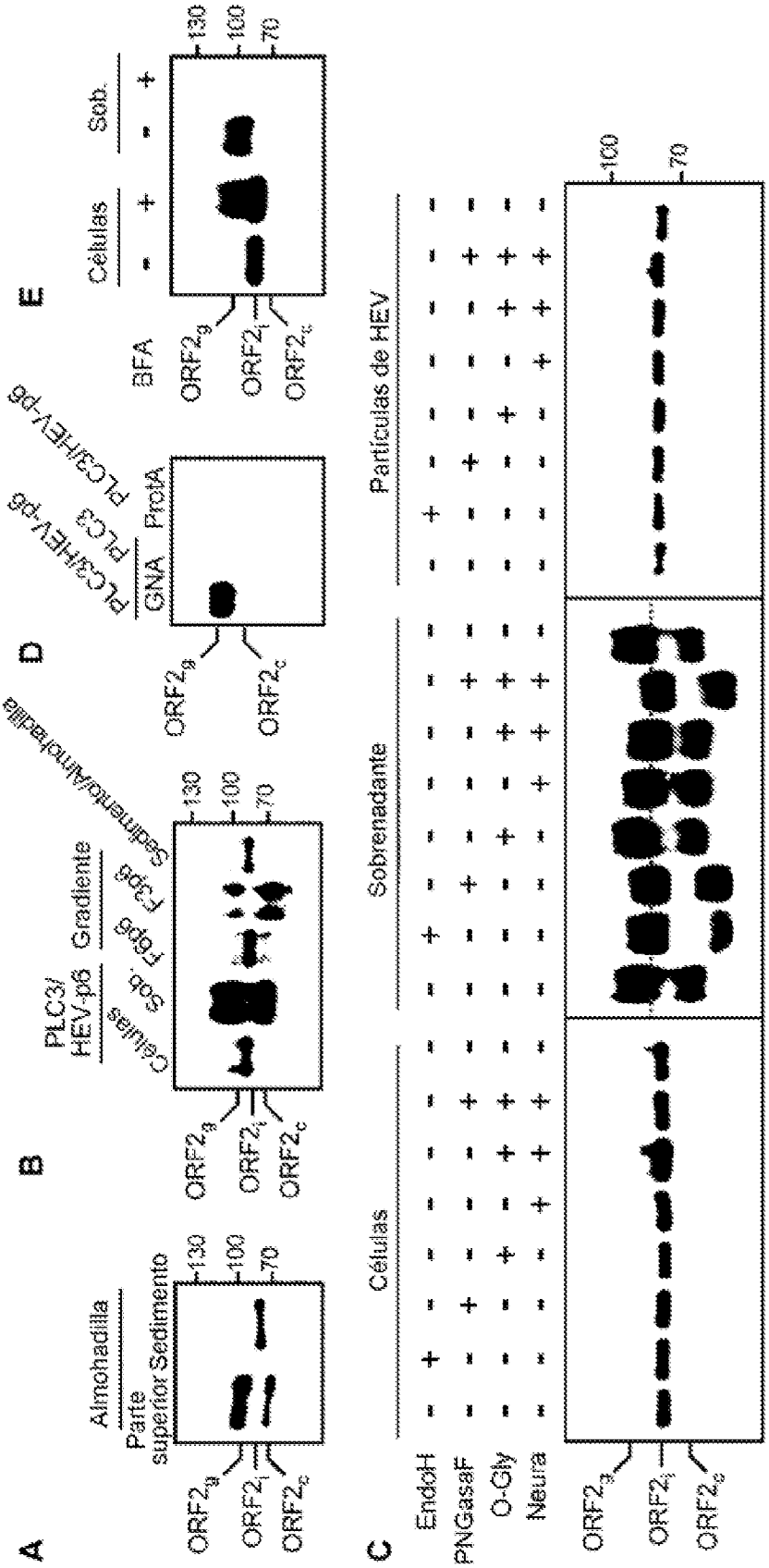
1. Polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2i) del virus de la hepatitis E aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1.

2. Polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2i) del virus de la hepatitis E aislado según la reivindicación 1, que no está glicosilado.

3. Polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2g) del virus de la hepatitis E aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2.

4. Polipéptido de la cápside ORF2 (ORF2g) del virus de la hepatitis E aislado según la reivindicación 3, que está glicosilado.

5. Molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según la reivindicación 1 ó 3.


A
Almohadilla
Parte superior
Sedimento
ORF2g
ORF2t
ORF2c
130
100
70
B
PLC3/HEV-p6
Células
Sob.
Gradiente
F6gb
F30gb
Sedimento/almohadilla
ORF2g
ORF2t
ORF2c
C
Células
Sobrenadante
Partículas de HEV
EndoH
PNGasaF
O-Gly
Neura
ORF2g
ORF2t
ORF2c
100
70
D
PLC3/HEV-p6
GNA
PLC3
ProtA
PLC3/HEV-p6
ORF2g
ORF2c
E
Células
Sob.
BFA
ORF2g
ORF2t
ORF2c
130
100
70

Figuras 1A-E

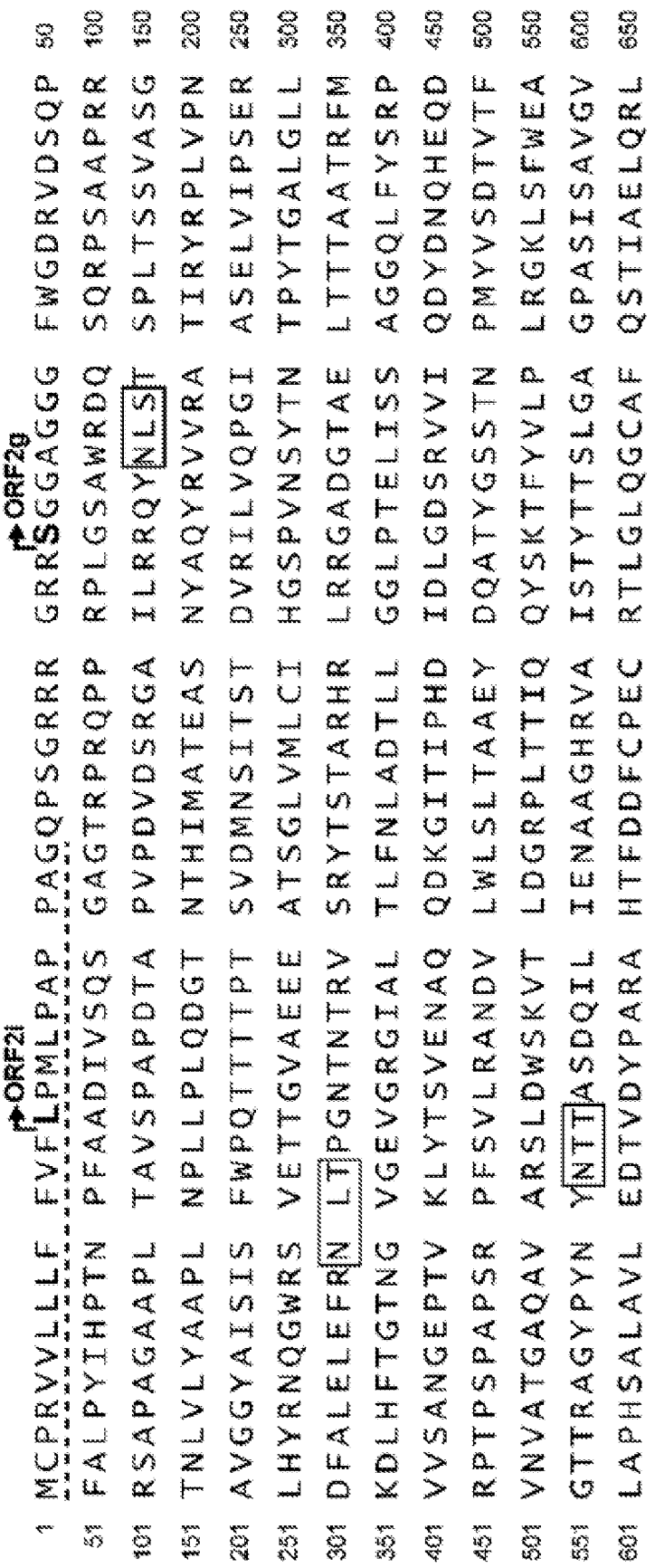

ORF2i
ORF2g
1 MCPRVVLLLF FVFLPMLPAP PAGQPSGRRR GRRSGGAGGG FWGDRVDSQP 50
51 FALPYIHPTN PFAADIVSQS GAGTRPRQPP RPLGSAWRDQ SQRPSAAPRR 100
101 RSAPAGAAPL TAVSPAPDTA PVPDVDSRGA ILRRQYNLST SPLTSSVASG 150
151 TNLVLYAAPL NPLLPLQDGT NTHIMATEAS NYAQYRVVRA TIRYRPLVPN 200
201 AVGGYAISIS FWPQTTTTPT SVDMNSITST DVRILVQPGI ASELVIPSER 250
251 LHYRNQGWRS VETTGVAEEE ATSGLVMLCI HGSPVNSYTN TPYTGALGLL 300
301 DFALEFRNLT PGNTNTRV SRYTSTARHR LRRGADGTAE LTTTAATRFM 350
351 KDLHFTGTNG VGEVGRGIAL TLFNLADTLL GGLPTELISS AGGQLFYSRP 400
401 VVSANGEPTV KLYTSVENAQ QDKGITIPHD IDLGDSRVVI QDYDNQHEQD 450
451 RPTPSPAPSR PFSVLRANDV LWLSLTAAEY DQATYGSSTN PMYVSDTVTF 500
501 VNVATGAQAV ARSLDWSKVT LDGRPLTTIQ QYSKTFYVLP LRGKLSFWEA 550
551 GTTRAGYPYN YNTTASDQIL IENAAGHRVA ISTYTTSLGA GPASISAVGV 600
601 LAPHSALAVL EDTVDYPARA HTFDDFCPEC RTLGLQGCAF QSTIAELQRL 650
651 KTEVGKTRES 660

Figura 1F

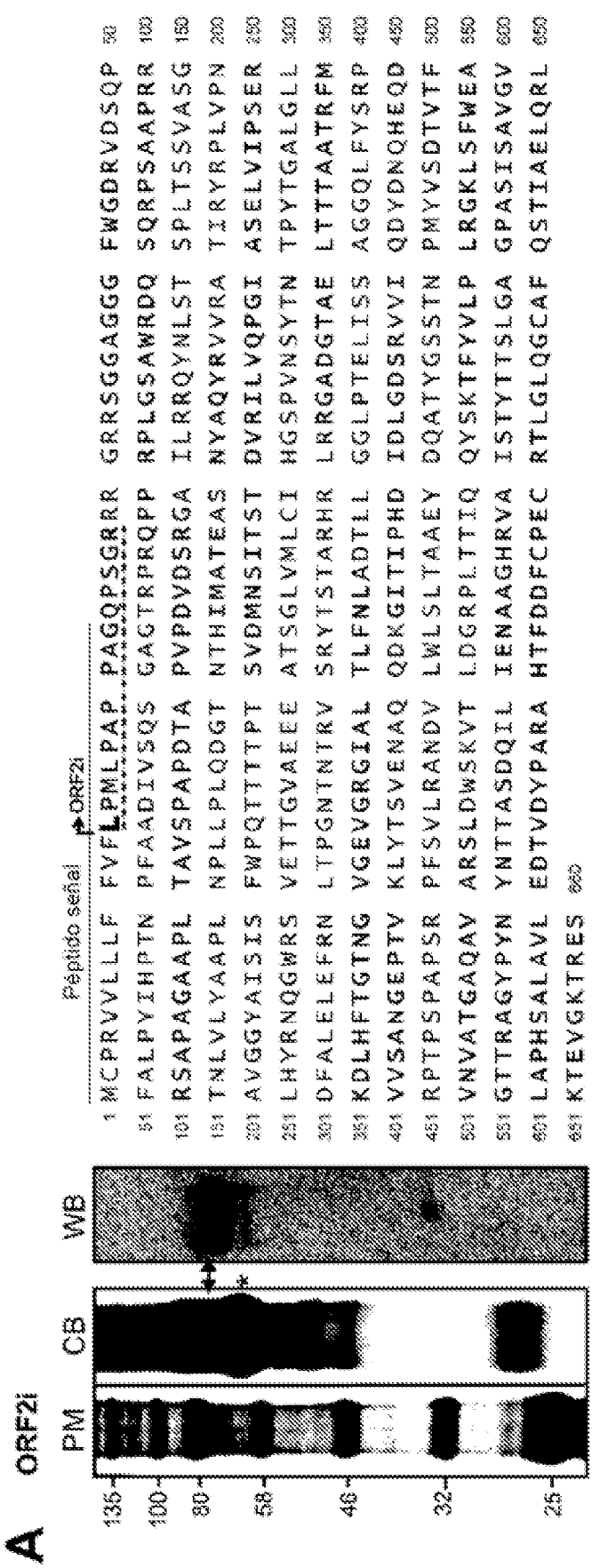

A
ORF2i
PM
CB
WB
136
100
80
58
46
32
25
Péptido señal
ORF2i
1 MCPRVVLLLF FVFLPMLPAP PAGQPSGRRR GRRSGGAGGG FWGDRVDSQP 50
51 FALPYIHPTN PFAADIVSQS GAGTRPRQPP RPLGSAWRDQ SQRPSAAPRR 100
101 RSAPAGAAPL TAVSPAPDTA PVPDVDSRGA ILRRQYNLST SPLTSSVASG 150
151 TNLVLYAAPL NPLLPLQDGT NTHIMATEAS NYAQYRVVRA TIRYRPLVPN 200
201 AVGGYAISIS FWPQTTTTPT SVDMNSITST DVRILVQPGI ASELVIPSER 250
251 LHYRNQGWRS VETTGVAEEE ATSGLVMLCI HGSPVNSYTN TPYTGALGLL 300
301 DFALELEFRN LTPGNTNTRV SRYTSTARHR LRRGADGTAE LTTTAATREM 350
351 KDLHFTGTNG VGEVGRGIAL TLFNLADTLL GGLPTELISS AGGQLFYSRP 400
401 VVSANGEPTV KLYTSVENAQ QDKGITIPHD IDLGDSRVVI QDYDNQHEQD 450
451 RPTPSPAPSR PFSVLRANDV LWLSLTAAEY DQATYGSSTN PMYVSDTVTF 500
501 VNVATGAQAV ARSLDWSKVT LDGRPLTTIQ QYSKTFYVLP LRGKLSFWEA 550
551 GTTRAGYPYN YNTTASDQIL IENAAGHRVA ISTYTTSLGA GPASISAVGV 600
601 LAPHSALAVL EDTVDYPARA HTFDDFCPEC RTLGLQGCAF QSTIAELQRL 650
651 KTEVGKTRES 660

Figura 2A

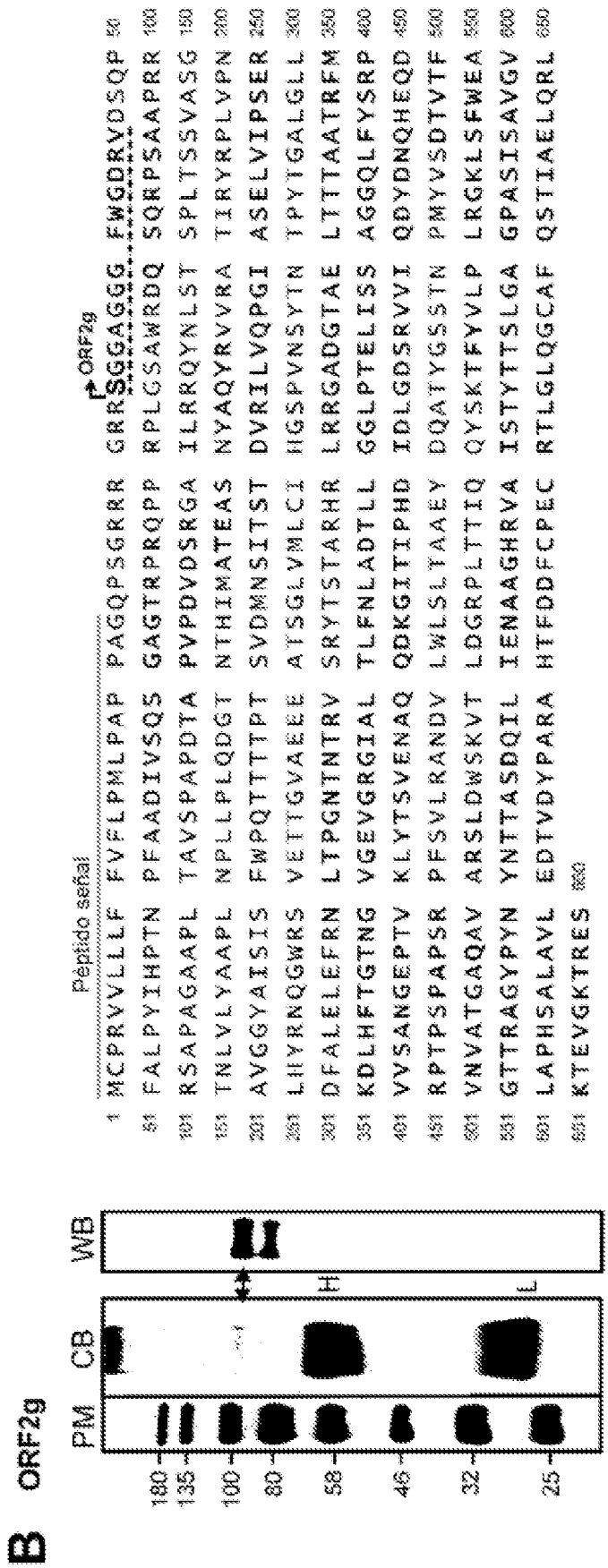

B
ORF2g
PM
CB
WB
H
L
180
135
100
80
58
46
32
25
Péptido señal
ORF2g
1 MCPRVVLLLF FVFLPMLPAP PAGQPSGRRR GRRSGGAGGG FWGDRVDSQP 50
51 FALPYIHPTN PFAADIVSQS GAGTRPRQPP RPLGSAWRDQ SQRPSAAPRR 100
101 RSAPAGAAPL TAVSPAPDTA PVPDVDSRGA ILRRQYNLST SPLTSSVASG 150
151 TNLVLYAAPL NPLLPLQDGT NTHIMATEAS NYAQYRVVRA TIRYRPLVPN 200
201 AVGGYAISIS FWPQTTTTPT SVDMNSITST DVRILVQPGI ASELVIPSER 250
251 LHYRNQGWRS VETTGVAEEE ATSGLVMLCI HGSPVNSYTN TPYTGALGLL 300
301 DFALELEFRN LTPGNTNTRV SRYTSTARHR LRRGADGTAE LTTTAATRFM 350
351 KDLHFTGTNG VGEVGRGIAL TLFNLADTLL GGLPTELISS AGGQLFYSRP 400
401 VVSANGEPTV KLYTSVENAQ QDKGITIPHD IDLGDSRVVI QDYDNQHEQD 450
451 RPTPSPAPSR PFSVLRANDV LWLSLTAAEY DQATYGSSTN PMYVSDTVTF 500
501 VNVATGAQAV ARSLDWSKVT LDGRPLTTIQ QYSKTFYVLP LRGKLSFWEA 550
551 GTTRAGYPYN YNTTASDQIL IENAAGHRVA ISTYTTSLGA GPASISAVGV 600
601 LAPHSALAVL EDTVDYPARA HTFDDFCPEC RTLGLQGCAF QSTIAELQRL 650
651 KTEVGKTRES 660

Figura 2B

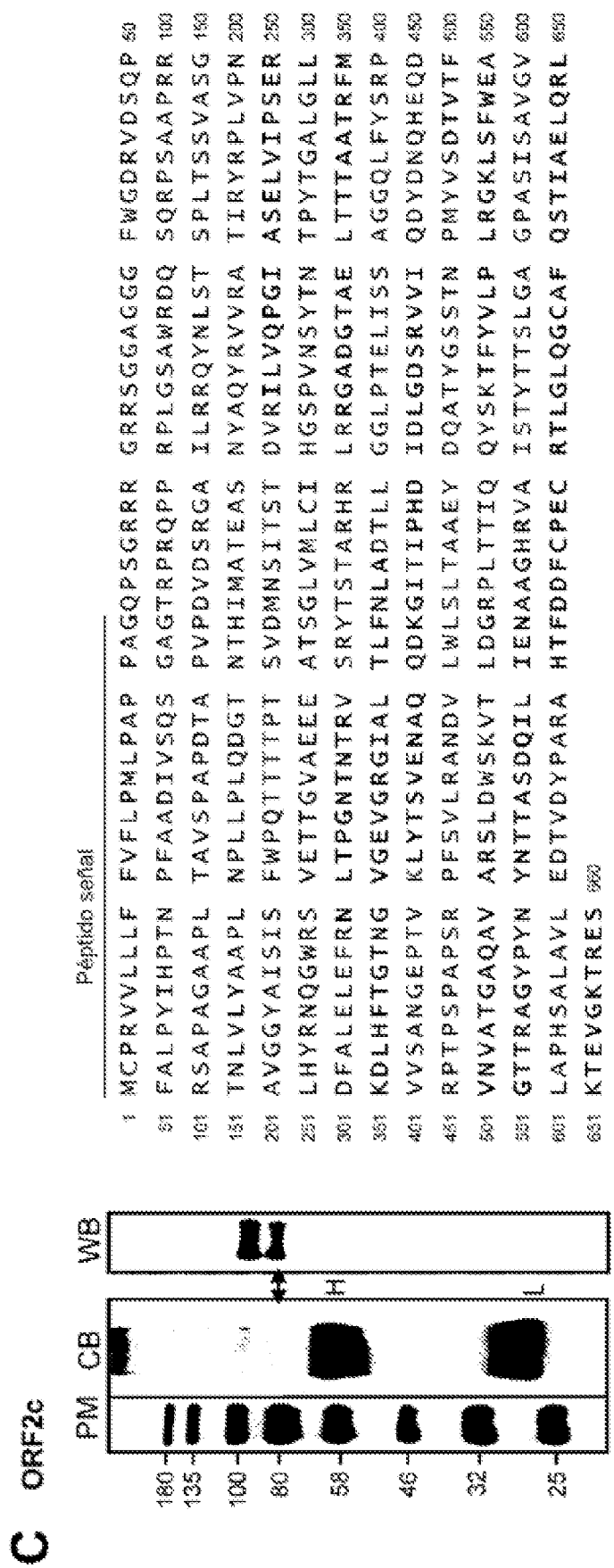
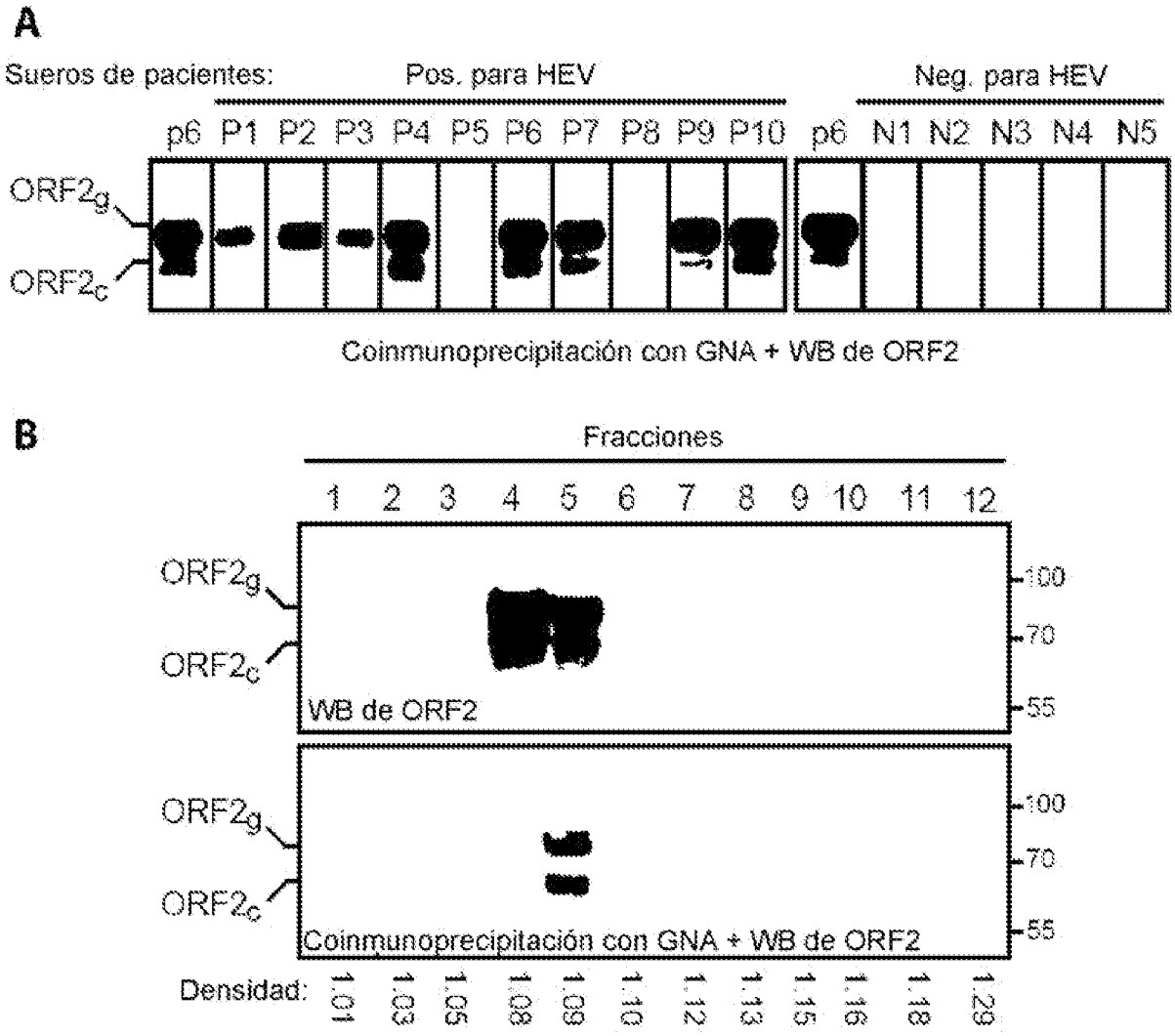
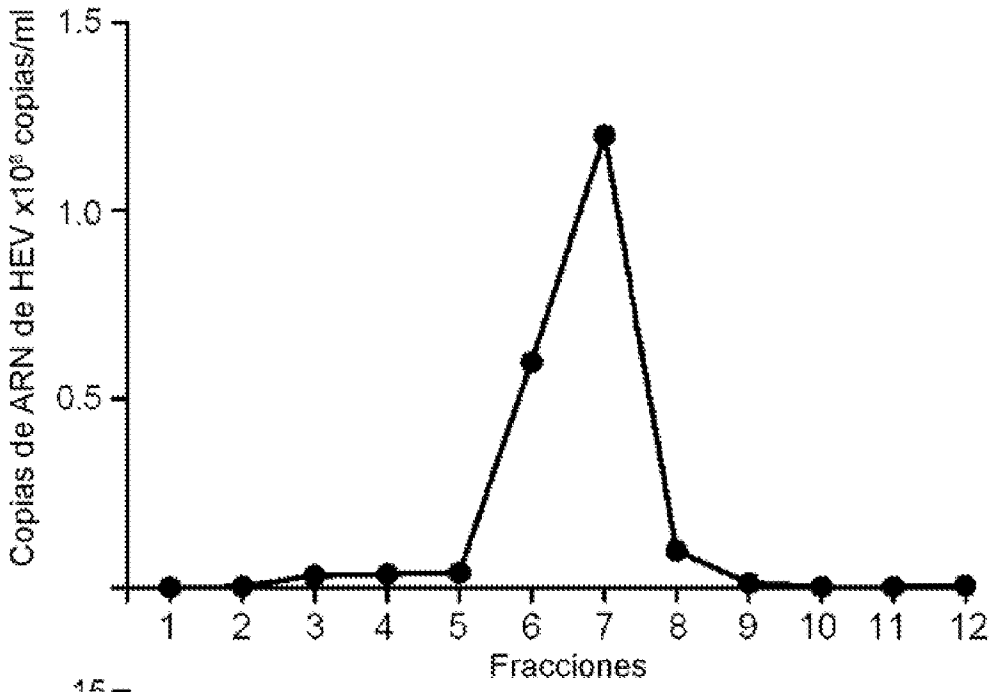

C
ORF2c
PM
CB
WB
H
L
180
135
100
80
58
46
32
25
Péptido señal
1 MCPRVVLLLF FVFLPMLPAP PAGQPSGRRR GRRSGGAGGG FWGDRVDSQP 50
51 FALPYTHPTN PFAADIVSQS GAGTRPRQPP RPLGSAWRDQ SQRPSAAPRR 100
101 RSAPAGAAPL TAVSPAPDTA PVPDVDSRGA ILRRQYNLST SPLTSSVASG 150
151 TNLVLYAAPL NPLLPLQDGT NTHIMATEAS NYAQYRVVRA TIRYRPLVPN 200
201 AVGGYAISIS FWPQTTTTPT SVDMNSITST DVRILVQPGI ASELVIPSER 250
251 LHYRNQGWRS VETTGVAEEE ATSGLVMLCI HGSPVNSYTN TPYTGALGLL 300
301 DFALELEFRN LTPGNTNTRV SRYTSTARHR LRRGADGTAE LTTTAATRFM 350
351 KDLHFTGTNG VGEVGRGIAL TLFNLADTLL GGLPTELISS AGGQLFYSRP 400
401 VVSANGEPTV KLYTSVENAQ QDKGITIPHD IDLGDSRVVI QDYDNQHEQD 450
451 RPTPSPAPSR PFSVLRANDV LWLSLTAAEY DQATYGSSTN PMYVSDTVTF 500
501 VNVATGAQAV ARSLDWSKVT LDGRPLTTIQ QYSKTFYVLP LRGKLSFWEA 550
551 GTTRAGYPYN YNTIASDQIL IENAAGHRVA ISTYTTSLGA GPASISAVGV 600
601 LAPHSALAVL EDTVDYPARA HTFDDFCPEC RTLGLQGCAF QSTIAELQRL 650
651 KTEVGKTRES 660

Figura 2C

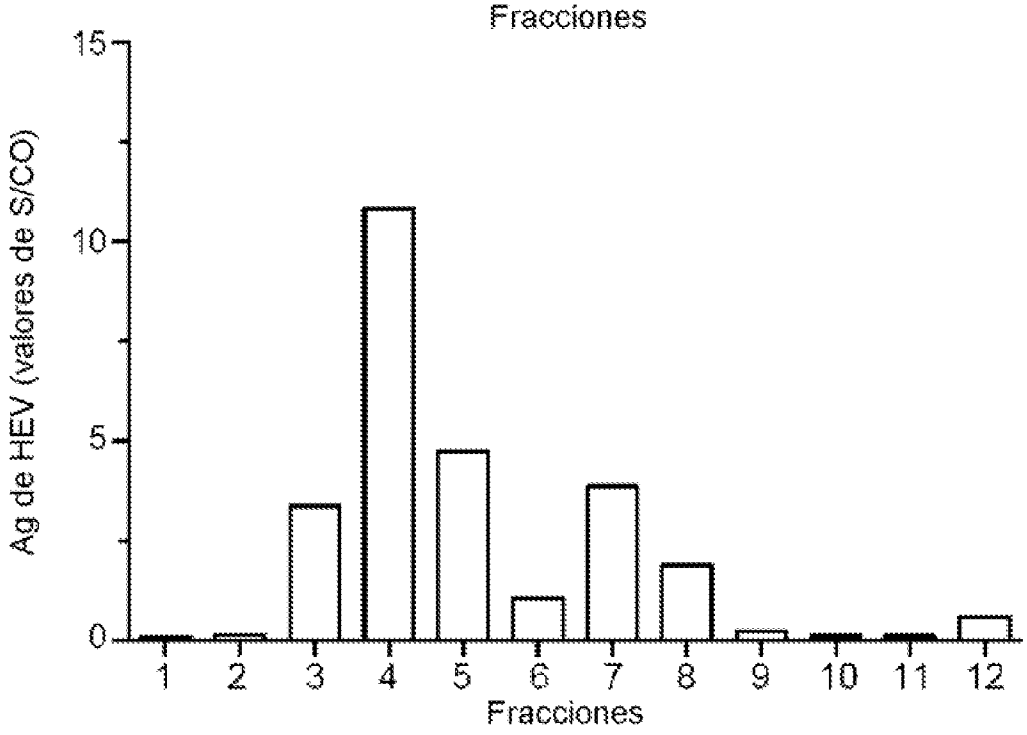


Figuras 3A y 3B

C



D



Figuras 3C y 3D

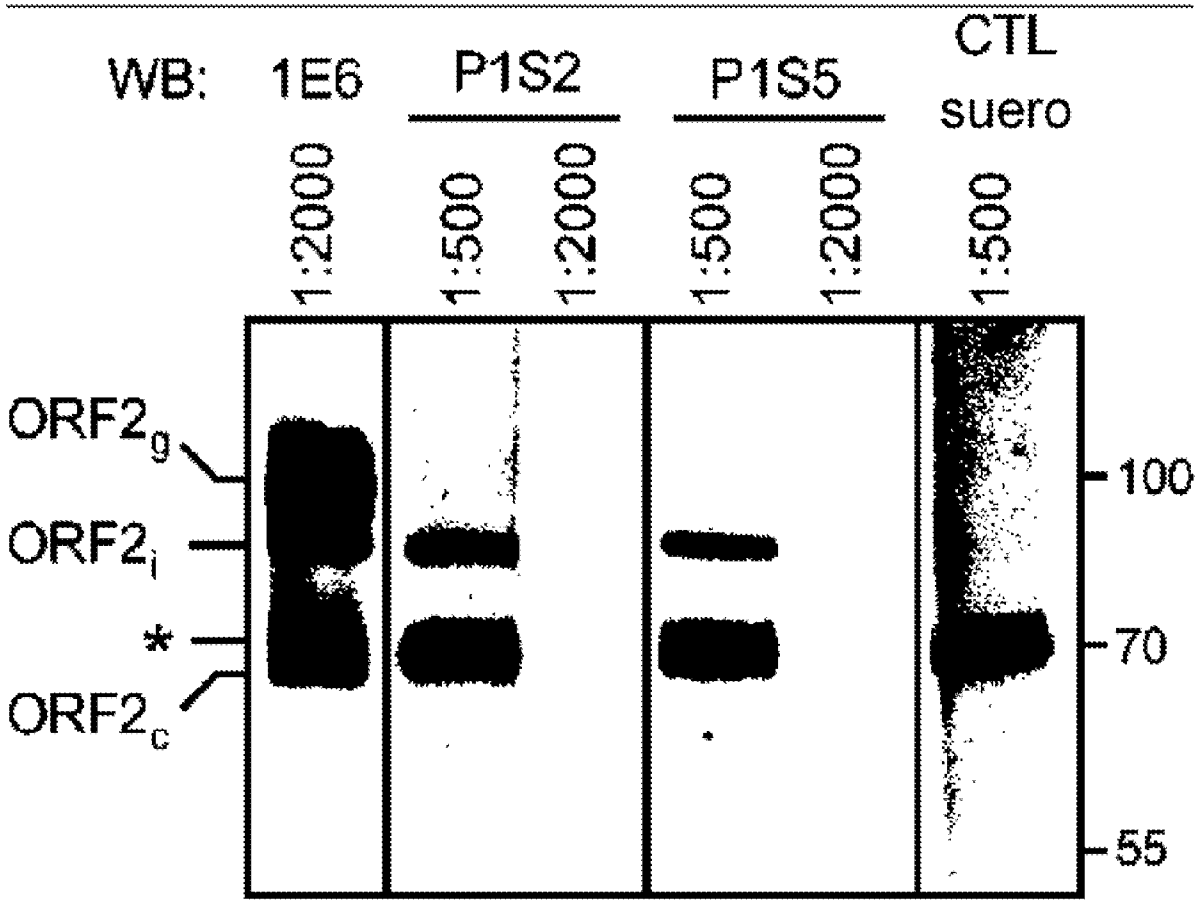

WB:
1E6
P1S2
P1S5
CTL
suero
1:2000
1:500
1:2000
1:500
1:2000
1:500
ORF2g
ORF2i
*
ORF2c
100
70
55

Figura 4