



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **93-00626**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **07.11.1991**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: **08.11.1990 US 611 419;**
08.11.1990 US 611 965;
13.09.1991 US 758 880;

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 91 / 08272 07.11.1991**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 92/08734 29.05.1992**

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.02.2000 BOPI nr. **2/2000**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0388232; 0318216

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **CHIRON CORPORATION, EMERYVILLE, US;**

(73) Titular: **CHIRON CORPORATION, EMERYVILLE, US;**

(72) Inventatori: **RALSTON O. ROBERT, DANVILLE 94526, US; MARCUS FRANK, DANVILLE, US;**
THUDUM B. KENT, OAKLAND, US; GERVASE A. BARBARA, VALLEJO, US; HALL A.
JOHN, ROHNERT PARK, US;

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER**
TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A ASIALOGLICOPROTEINELOR**
PURIFICATE PROVENIND DE LA VIRUSUL HEPATITEI C

(57) **Rezumat:** Invenția prezintă un procedeu de obținere a asialoglicoproteinelor purificate, provenite de la virusul hepatitei C, cuprinzând dezvoltarea pe un mediu de cultură adecvat a unei celule - gazdă, transformată cu o genă structurală ce codifică o asialoglicoproteină

HCV selectată din grupul E₁ și/sau E₂, provocarea expresiei genei structurale în condiții care favorizează inhibarea sialilării și izolarea asialoglicoproteinelor obținute prin cuplarea cu o lectină capabilă să lege manoza terminală.

Revendicări: 8

RO 115446 B1



RO 115446 B1

Invenția se referă la un procedeu de obținere a asialoglicoproteinelor purificate provenind de la virusul hepatitei C (HCV), în scopul utilizării lor în prevenirea și tratamentul hepatitei cu virusul C.

Se cunoaște că virusul hepatitei C (HCV) s-a dovedit a fi agentul etiologic principal al hepatitei serice non-A non-B (**EP 388232 A1**). Au fost izolate noi secvențe și polipeptide ale virusului hepatitei C care și-au găsit aplicații în teste imunologice, în producerea de anticorpi anti-HCV, în tehnologia DNA recombinant.

De asemenea, se cunoaște că s-a încercat obținerea unor noi polipeptide imunogene codificate cu clone conținând cDNA provenit de la virusul hepatitei C (HCV), și faptul că s-au realizat metode noi pentru purificarea unei polipeptide HCV imunogene.

Din **WO 89/146699** se cunoaște că au fost identificate recent noi specii ale virusului hepatitei C, ca fiind, în primul rând, cauza hepatitei non-A non-B transmisibilă prin sânge (hepatita BB- non-A, non-B).

În **EP 318216 A1** este descrisă o familie de secvențe cDNA derivate de la virusul hepatitei C (HCV), care codifică antigeni cu proprietatea de a reacționa imunologic cu anticorpi prezenți la indivizi având hepatita non-A non-B (NANBH), dar care, în general, lipsesc de la indivizii infectați cu virusul hepatitei A (HAV) sau virusul hepatitei B (HBV).

Procedeu de obținere a asialoglicoproteinelor purificate provenind de la virusul hepatitei C(HCV), conform invenției, constă în dezvoltarea pe un mediu de cultură adecvat a unei celule-gazdă transformată cu o genă structurală ce codifică o asialoglicoproteină a virusului hepatitei C selectată din grupul E₁ și/sau E₂, provocarea expresiei sialilării și izolarea asialoglicoproteinelor virusul hepatitei C(HCV) din cultura de celule prin cuplarea cu o proteină care leagă manoză terminală.

Avantajele pe care le oferă invenția sunt legate de izolarea și purificarea unor proteine ale virusului hepatitei C exprimate fără sialilare, având ca rezultat obținerea de recombinanți proteici similari glicoproteinelor native din virusul hepatitei C și care, se pot utiliza sub formă de agregate de tip like-virus, cu utilizări în obținerea de vaccinuri și teste imunologice.

Hepatita non-A și non-B (NANBH) este o boală transmisibilă (sau o familie de boli) care se pare că este indusă pe cale virală și se distinge de alte forme de boli de ficat asociate cu virusuri, cum ar fi, de exemplu, cele cauzate de virusul hepatitei A (HAV), virusul hepatitei B (HAB), virusul hepatitei delta (HDV), cu citomegalovirus (CMV) sau cu virusul Epstein-Barr (EBV). Evidența epidemiologică sugerează că există trei tipuri de hepatite Non-A și Non-B: tipul epidemic transmisibil prin apă; tipul asociat transmisibil prin sânge-ac de seringă și sporadic se produce tipul dobândit în mod obișnuit. Numărul de agenți cauzativi este necunoscut. Hepatita cu virus C pare să fie forma predominantă de hepatită legată de transfuzie, într-un număr de țări sau de regiuni incluzând Statele Unite, Europa și Japonia. Este evidentă, așadar, implicarea virusului hepatitei C (HCV) în inducerea carcinomului hepatocelular. Astfel, apare necesitatea unei metode eficiente pentru prevenirea și tratamentul infecției în hepatita cu virus C (HCV). Necesitatea unor metode sensibile, specifice pentru screeningul și identificarea transporturilor, în cazul hepatitei cu virusul C (HCV) și în cazul produselor din sânge și a produselor din sânge contaminate cu virusul hepatitei C (HCV) este semnificativă. Hepatita post-transfuzională (PHT) se produce, la aproximativ 10 % din pacienții transfuzați și virusul hepatitei C (HCV) se evidențiază, la peste 90 % din aceste cazuri. Problema majoră în această boală este avansarea frecventă la boli cronice de ficat (25...55 % din cazuri).

RO 115446 B1

Îngrijirea pacientului, ca și prevenirea transmiterii virusului hepatitei C prin sânge sau produse din sânge sau printr-un contact personal strâns, necesită instrumente precise de diagnostic și prognostic, pentru detectarea acizilor nucleici, a antigenilor și anticorpilor referitor la virusul hepatitei C (HCV). În plus, există, de asemenea, necesitatea unor vaccinuri eficiente și a unor agenți imunoterapeutici pentru prevenirea și/sau tratamentul bolii. 50 55

Virusul hepatitei C (HCV) apare în sângele indivizilor infectați în proporții relativ scăzute față de alte tipuri de infecții cu virusuri, ceea ce face ca virusul să fie foarte dificil de detectat. Greutatea virală scădută este probabil cauza primară pentru care virusul hepatitei non-A, non-B este dificil de detectat. Chiar dacă, totuși, în prezent acest vector a fost clonat, virusul hepatitei C (HCV) s-a dovedit a fi încă dificil de cultivat și propagat. În acest sens, există o necesitate acută, în ceea ce privește tehnicile de recombinare pentru producerea proteinelor de diagnostic/tratament și profilaxie a hepatitei cu virusul C. 60

În plus este foarte necesară existența unui vaccin pentru hepatita cu virus C. Deoarece, însă este extrem de dificilă cultivarea virusului hepatitei C în linii celulare, n-a fost posibil să se producă specii virale atenuate prin treceri seriale în culturi de țesuturi sau culturi de celule. 65

S-a descoperit că două proteine ce conțin virusul hepatitei C, E1 și E2, par a fi asialoglicoproteine asociate membranei, când sunt exprimate în sisteme recombinante. Acest fapt este surprinzător, deoarece la mamifere glicoproteinele nu rămân, de obicei sub forma cu manoză terminală, fiind modificate, în continuare cu alte tipuri de carbohidrați; forma cu manoză terminală este în mod tipic numai de tranziție. În cazul E1 și E2 (așa cum s-a exprimat în sistemele noastre), asialoglicoproteina pare a fi în formă finită. E1 (proteina 1 de acoperire) este o glicoproteină având o greutate moleculară de aproximativ 35 kD, care este transferată din regiunea E1 prevăzută pentru genomul virusului hepatitei C. E2 (proteina 2 de acoperire) este o glicoproteină având o greutate moleculară, de aproximativ 72 kD, care este transferată de la regiunea NS1 prevăzută (proteina 1 nestructurală) a genomului virusului hepatitei C, pe baza modelului flaviviral al virusului hepatitei C. Deoarece, glicoproteinele virale sunt adesea puternic imunogene, E1 și E2 reprezintă primii candidați pentru utilizare în imunoanalize și pentru tratament și vaccinuri profilactice. 70 75 80

Este semnificativă descoperirea că E1 și E2 nu sunt sialilate. Forma particulară a unei proteine dictează adesea, care celule pot servi ca gazde corespunzătoare pentru exprimarea recombinantă. Procariotele, cum ar fi, de exemplu, *Escherichia coli*, nu produc glicosilarea proteinelor și, în general nu sunt corespunzătoare pentru producerea glicoproteinelor utilizate ca antigeni, deoarece glicozilarea este adesea importantă pentru completa antigenitate, solubilitate și stabilitate a proteinei. Eucariotele inferioare, cum ar fi, de exemplu, drojdiile și fungii, produc glicozilarea proteinelor, dar sunt, în general, necorespunzătoare, în ceea ce privește adăugarea grupărilor terminale de acid sialic la complexii de carbohidrați. Astfel, proteinele derivate din drojdii pot fi deosebite din punct de vedere antigenic de corespondenții naturali (nerecombinanți). Pentru aplicațiile în care antigenitatea produsului este importantă, este preferată exprimarea în celulele mamiferelor, deoarece glicozilarea proteinei recombinante poate fi foarte asemănătoare cu cea, în cazul proteinelor virale la animalele sălbatice. 85 90 95

Noi date arată că în timpul infecției, virusul hepatitei C (HCV) poate pătrunde în celulele gazdă, fie cu ajutorul receptorului asialoglicoproteinei descoperit pe hepatocite, fie cu ajutorul receptorilor manozei descoperiți pe celulele endoteliale hepatice

și pe macrofagii hepatici (în special celulele Kupffer). S-a descoperit că în mod surprinzător, majoritatea proteinelor naturale E1 și E2 nu conțin grupări terminale de acid sialic, dar că acestea sunt glicozilate, numai în porțiunile inferioare. O fracțiune îngustă conține adițional N-acetil glucozamine terminale. În acest sens, obiectul prezentei invenții este un procedeu de obținere a unor glicoproteine (E1 și E2) de acoperire a virusului hepatitei C, la care lipsesc toate sau aproape toate grupările terminale de acid sialic, denumite de aceea asialoglicoproteine.

Termenul de "asialoglicoproteină" se referă la o proteină glicozilată care este substanțial liberă de resturi de molecule de acid sialic. Asialoglicoproteinele pot fi obținute prin recombinare sau prin purificare dintr-o cultură de celule sau din surse naturale. Asialoglicoproteinele preferate în prezent sunt derivate de la virusul hepatitei C (HCV), de preferință glicoproteinele E1 și E2, preferate fiind proteinele recombinante E1 și E2 (rE1 și rE2). O proteină este "substanțial liberă" de acid sialic conform acestei definiții, dacă numărul de resturi de acid sialic nu interferează substanțial cu legăturile glicoproteinei la proteinele legate de manoză, cum ar fi, de exemplu GNA. Acest grad de sialilare va fi obținut, în general, atunci când mai puțin, de aproximativ 40%, din carbohidratul total legat la azot este acid sialic, mult mai preferabil atunci când există mai puțin, de aproximativ 30 %, mult mai preferabil atunci când există mai puțin, de aproximativ 20%, mult mai preferabil la mai puțin, de aproximativ 10 %, mult mai preferabil la mai puțin, de aproximativ 5% și mult mai preferabil la mai puțin decât, aproximativ 2 %.

Termenul de "E1" utilizat în prezenta invenție se referă la o proteină sau la o polipeptidă exprimată ca fiind formată din primii 400 de aminoacizi ai poliproteinei virusului hepatitei C, uneori referindu-se la aceasta ca la proteina E sau proteina S. În forma naturală există o proteină cu greutate moleculară de 35 kD, care s-a găsit a fi puternic asociată la membrană. La majoritatea speciilor naturale de virusuri ale hepatitei C (HCV) proteina E1 este codificată în poliproteina virală, după care urmează proteina C (partea interioară). Proteina E1 se întinde de la, aproximativ aminoacidul 192, la aproximativ aminoacidul 383, din catena totală a poliproteinei. Termenul de "E1" așa cum este utilizat în prezenta invenție, include așadar analogi și mutanți secționați care sunt încrucișați din punct de vedere imunologic, cu proteina naturală E1.

Termenul de "E2" utilizat în prezenta invenție se referă la o proteină sau la o polipeptidă exprimată ca fiind formată din primii 900 de aminoacizi din poliproteina virusului hepatitei C (HCV), iar uneori se referă la proteina NS1. În forma sa naturală aceasta este o glicoproteină cu greutatea moleculară 72 kD, care a fost găsită ca fiind puternic asociată la membrană. În cazul majorității speciilor naturale de virus al hepatitei C, proteina E1 urmează proteina E2. Proteina E2 se întinde, de la aproximativ aminoacidul 384 până la, aproximativ aminoacidul 820. Termenul de "E2" este utilizat în prezenta invenție incluzând analogi și mutanți secționați, care sunt din punct de vedere imunologic reactiv încrucișați cu proteina naturală E2.

Termenul de "agregat" utilizat în prezenta invenție se referă la un complex de E1 și/sau E2 conținând mai mult decât un monomer E2. Dimerii E1:E2, dimerii E2:E3 și heterodimerii E1:E2 sunt toți "agregate" conform scopului prezentei definiții. Compozițiile, conform prezentei invenții, pot include, așadar agregate mai mari și pot avea greutăți moleculare de peste 800 kD.

Termenul de "particulă" utilizat în prezenta invenție se referă la agregatul E1/E2 sau la E1, la E2 care sunt vizibili prin microscopie electronică și au dimensiuni de cel puțin 20 nm. Particulele preferate sunt cele care au o prezentare sferică, brută și un diametru de aproximativ 40 nm, prin microscopie electronică.

Termenul de "purificat" așa cum este aplicat la proteine, se referă la o compoziție în care proteina dorită cuprinde cel puțin 35% din componentele totale de proteine din compoziție. Proteina dorită cuprinde, de preferință, cel puțin 40%, mult mai preferabil, cel puțin 40 %, mult mai preferabil, cel puțin aproximativ 50 %, chiar mult mai preferabil, cel puțin aproximativ 60%, încă mult mai preferabil, cel puțin aproximativ 70%, chiar mult mai preferabil, cel puțin aproximativ 90% și cel mai preferabil, cel puțin aproximativ 95% din componentele de proteine totale. Compoziția poate conține alți compuși, cum ar fi, de exemplu, carbohidrați, săruri, lipide, solvenți și alți compuși asemănători, fără a fi afectată determinarea procentajului de puritate, așa cum s-a utilizat în prezenta invenție. O asialoglicoproteină "izolată" a virusului hepatitei C (HCV), se referă la o compoziție de asialoglicoproteine HCV, care este cel puțin de puritate 35 %.

"Proteina care leagă manoză" ca termen utilizat în prezenta invenție, se referă la o lecitină sau la o altă proteină, care se leagă, în mod specific, de proteinele având manoză terminală glicozilată (cum sunt asialoglicoproteinele), de exemplu, lectinele legate de manoză, anticorpii specifici pentru manoză terminală glicozilată, proteina receptor conținând manoză, (R.A.B. Ezekowitz și colaboratorii, J.Exp.med. (1990) 176: 1785-94), proteine receptor conținând asialoglicoproteine (H.Kurata și colaboratorii, J.Biol.Chem (1990) 265:11295-98), proteine serice legate la manoză (I.Schuffenecker și colaboratorii, Cytogenet Cell Genet (1991) 56:99-102; K.Sastry și colaboratorii, J.Imunol. (1991) 147:692-97), proteine serice legate de asialoglicoproteine și alți compuși asemănători. Lectinele legate de manoză includ, de exemplu GNA, Concanavalin A (ConA) și alte lectine cu proprietăți de legare similare.

Termenul de "lectină GNA" se referă la aglutinina din *Galanthus nivalis*, o lectină disponibilă comercial care se leagă la glicoproteinele cu manoză terminală.

O glicoproteină "recombinantă" așa cum este utilizat acest termen în prezenta descriere de invenție, este o glicoproteină exprimată dintr-o polinucleotidă recombinată, în care gena structurală care codifică glicoproteina este exprimată sub controlul secvențelor de reglare nediacente, în mod natural la gena structurală sau în care gena structurală este modificată. De exemplu, una dintre acestea poate forma un vector în care gena structurală E1 este plasată sub controlul unui fragment funcțional al promotorului de gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) de drojdie. Un promotor utilizat, de preferință, în drojdii, este promotorul hibrid ADH2/GAPD, descris în **US 4880734**, care utilizează un fragment promotor GAPDH în combinație cu o secvență de activare în amonte, derivată de la alcool dehidrogenaza-2. Modificările genei structurale pot include substituția diferiților codoni, cu codoni degenerați (de exemplu, pentru utilizarea codonilor gazdă preferați, se elimină sau se generează porțiunile de clivaj ale enzimei de restricție, pentru controlul formării formelor aciculare, etc) și substituția, inserarea sau eliminarea unui număr limitat de codoni pentru codificarea diferiților aminoacizi (de preferință, nu mai mult, de aproximativ 10 %, mult mai preferabil sub, aproximativ 5% dintr-un număr de secvențe de aminoacizi naturali, care pot fi modificate) și altele asemănătoare.

În mod similar, receptorul "recombinant" se referă la o proteină receptor care este exprimată dintr-o polinucleotidă recombinantă, în care gena structurală, care codifică receptorul, este exprimată sub controlul secvențelor de reglare adiacente nu în mod natural, la gena structurală, sau în care gena structurală este modificată.

Termenul de "polipeptidă izolată" se referă la un tip de polipeptidă care poate fi substanțial liberă de alte componente virale în cadrul virusului hepatitei C (HCV), în special nucleotide de tip polinucleotide. O compoziție de polipeptidă poate fi, în mod

“substanțial liberă” de alte componente, dacă greutatea acestei polipeptide în compoziție este, de cel puțin 70 % în greutate polipeptide și alte componente în combinație, mult mai preferabil, de cel puțin, aproximativ 80 % în greutate polipeptide, încă mult mai preferabil, de aproximativ 90 % în greutate polipeptide și, cel mai preferabil, de 95 % sau mai mult. De exemplu, o compoziție care conține 100 µg/ml de E1 și numai 3 µg/ml de alte componente ale virusului hepatitei C (HCV), (de exemplu, acidul dezoxiribonucleic DNA, lipide, etc) care sunt substanțial libere de “alte componente virale ale virusului hepatitei C” și astfel este o compoziție de polipeptide izolate, conform scopului acestei definiții.

Termenul de “lider de secreție” se referă la o polipeptidă care, atunci când este codificată la porțiunea N-terminală a proteinei produce o proteină secretată în mediul de cultură celulară după translație. Liderul de secreție, în general, va deriva din celula gazdă utilizată. De exemplu, liderii corespunzători de secreție pentru utilizare în drojdii includ factorul *alfa*-linder *Saccharomyces cerevisiae* (**US 487008**).

Termenul de “eucariote inferioare” se referă la celule gazdă, cum ar fi drojdii, fungi și altele. Eucariotele inferioare sunt, în general (dar nu în mod necesar) unicelulare. Eucariotele inferioare preferate sunt drojdiile, în special, specii de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* și altele. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. Carlsbergensis* și *K. lactis* sunt cele mai utilizate drojdii cu rol de gazdă, fiind cele mai convenabile gazde pentru fungi.

Termenul de “eucariote superioare” se referă la celule-gazdă derivate de la animale superioare, cum ar fi, de exemplu, mamifere, reptile, insecte și altele. Celulele gazdă de eucariote superioare preferate, în prezent sunt derivate de la hamsterul chinezesc (de exemplu, CHO), maimuțe (de exemplu, celule COS), om și insecte (de exemplu, *Spodoptera frugiperda*). Celulele gazdă pot fi utilizate ca suspensii sau culturi la baloane, culturi de țesuturi, culturi de organe și altele.

Termenul de “modulator de calciu” se referă la un compus capabil să capteze sau să lege ioni de calciu în reticulul endoplasmic sau care este capabil să modifice concentrația ionilor de calciu în acesta, prin efectul asupra proteinelor care reglează calciu (de exemplu, proteinele cu canale de calciu, pompe de calciu, etc). Modulatorii de calciu convenabili includ, de exemplu, *thapsigargina*, EGTA [acid etilenglicol (β-amino etil eter)-N,N,N',N'-tetraacetic]. Modulatorul preferat în prezent este *thapsigargina* (O.Thastrup și colaboratorii, Proc.nat.Acad.Sci. USA (1990) 87:2466-70).

Termenul de “imunogen” se referă la capacitatea unei substanțe de a produce un răspuns imun celular și/sau umoral atunci când este singură sau este legată la un suport, în prezența sau în absența unui adjuvant. “Neutralizarea” se referă la un răspuns imun care blochează infectivitatea, parțial sau total a agentului infecțios. Un “vaccin” este o compoziție imunogenă capabilă să confere protecție față de virusul hepatitei C (HCV) fie parțial, fie complet, fiind folosite pentru tratamentul unui individ.

Termenul de “lichid biologic” se referă la un fluid obținut dintr-un organism, cum ar fi serul, plasma, saliva, secrețiile gastrice, mucusul și altele. În general, un lichid biologic va fi ales pentru prezența particulelor de virus al hepatitei C. Unele fluide biologice sunt utilizate ca sursă a altor produse, cum ar fi, de exemplu, factorii de coagulare (de exemplu, factorul VIII:C), albumina serică, hormonul de creștere și alții.

În astfel de cazuri, este important ca sursa de fluid biologic să fie liberă de contaminare cu virusuri, cum ar fi, de exemplu, virusul hepatitei C.

Regiunea E1 a genomului virusului hepatitei C (HCV), este descrisă în **EP 388232**, ca regiunea “E”, în timp ce E2 este descrisă ca “NS1”. Regiunea E1

RO 115446 B1

cuprinde aminoacizii 192-383 din catena poliproteinei virale. Regiunea E2 cuprinde, aproximativ aminoacizii 384-820. Secvențele complete ale prototipurilor acestor proteine (tulpina HCV-1) sunt disponibile (**EP 388232**), ca metode generale pentru clonarea și exprimarea dintr-o polinucleotidă codificând primii 850 - 900 aminoacizi ai poliproteinei HCV; procedeele post-tranlaționale în majoritatea celulelor-gazdă eucariote clivează poliproteina inițială, în C, E1 și E2. 250

Poate fi secționat capătul 5' a regiunii codificate pentru a se reduce cantitatea de proteină C produsă.

Exprimarea asialoglicoproteinelor poate fi realizată printr-un număr de metode. De exemplu, una din acestea poate obține exprimarea în eucariote inferioare (cum ar fi, drojdiile), care nu adăunează în mod normal resturile de acid sialic la proteinele glicozilate. În sistemele de exprimare la drojdii se preferă să se utilizeze în prezent un lider de secreție, cum ar fi, de exemplu, factorul *alfa* al liderului de secreție *Saccharomices cerevisiae*, astfel ca proteina să fie exprimată în mediu de cultură după tranlație. De asemenea, se preferă, în prezent să se utilizeze mutanți cu deficiențe de glicozilare, ca de exemplu, *pmrl*, deoarece acești mutanți furnizează numai glicozilarea internă și adesea secretă proteine heteroloage cu eficiență ridicată (H. K. Rudolph și colaboratorii, *Cell* (1989) 58: 133 - 45). În mod alternativ, una din metode poate utiliza alte specii de drojdii, cum ar fi, de exemplu, *Pichia pastoris*, care exprimă glicoproteine cu 8 - 9 resturi de manoză, într-un model care se crede că se aseamănă cu modelul glicozilării interne observat la mamifere și la *Saccharomices cerevisiae*. 255 260 265

În mod alternativ, printr-una din metode se poate obține exprimarea în celulele de mamifere și blocarea glicozilării terminale (adiție de acid sialic). Construcțiile de recombinanți vor include, de preferință, un semnal de secreție pentru a se asigura că proteina este direcționată spre reticulul endoplasmic. Transportul la aparatul Golgi pare a fi blocat chiar de către proteinele E1 și E2; exprimarea la nivel înalt a E1 sau E2 în celulele de mamifere pare să oprească secreția tuturor proteinelor celulare la reticulul endoplasmic sau *cis* Golgi. În mod adițional, una din metode poate să utilizeze un mutant defectiv de glicozilare (P.Stanley, *Ann. Rev.gener.* (1984) 18:525-52). În cazul în care mutantul de glicozilare sau de transport exprimă E1 sau E2 cu sialare, reziduurile terminale de acid sialic pot fi îndepărtate prin tratament cu neuraminidază. 270 275

Randamentul poate fi crescut ulterior prin utilizarea unui modulator de calciu pentru a obține eliberarea proteinei din reticulul endoplasmic. Astfel de modulatori includ *thapsigargina*, EGTA și A23817 (O.Thastrup și colaboratorii, *proc.Nat.Acad. Sci. USA* (1990), 87, 2466-70). De exemplu, se pot exprima cantități mari de E1 sau E2 intracelulare în celule de mamifere (de exemplu, CHO, COS, celule HeLa și altele), prin transfectarea cu un vector recombinant al virusului vaccinei. După ce se lasă un timp pentru exprimarea proteinei și acumularea în reticulul endoplasmic, celulele sunt expuse la un modulator de calciu într-o concentrație suficient de mare pentru a produce eliberarea conținuturilor reticulului endoplasmic. Proteina este apoi recuperată din mediul de cultură, care este înlocuit pentru ciclul următor. 280 285

În plus, este avantajos să se exprime o formă secționată în proteina de acoperire. Atât proteina E1, cât și proteina E2 par a avea un domeniu hidrofobic superior care, aparent, fixează proteina în reticulul endoplasmic și previne eliberarea sa. Astfel, una din metode prevede eliminarea porțiunilor de secvență găsite într-una sau în mai multe din regiunile conținând aminoacizii 170 - 190, aminoacizii 260 - 290 sau aminoacizii 330 - 380 ale proteinei E1 (numărând de la începutul poliproteinei) și aminoacizii 660 - 830 din proteina E2 (vezi, de exemplu, fig. 20-1 din **EP 388232**). Este ca și cum, cel puțin unul din aceste domenii hidrofobe formează o regiune 290

295 transmembranară, care nu este esențială pentru antigenitatea proteinei și care, astfel, poate să fie eliminată fără nici o consecință. Cea mai bună regiune pentru eli-
minare, poate fi determinată prin conducerea unui număr mic de experimente de
300 eliminare în cadrul acestei specialități de către specialiștii obișnuiți. Eliminarea porțiu-
nilor hidrofobe 3' terminale ale proteinei E2 are ca rezultat secreția unei porțiuni din
proteina E2, exprimată cu sialilarea proteinei secretate.

Pentru obținerea exprimării se poate utiliza orice varietate de vectori. Eucariotele inferioare, cum sunt drojdiile, sunt tipic transformate cu plasmide utilizând metoda de precipitare cu fosfat de calciu sau sunt transfectate cu ajutorul unui virus recombinant. Vectorii pot fi replicați independent în celulele - gazdă sau pot fi integrați
305 în genomul celulei-gazdă. Eucariotele superioare pot fi transformate cu plasmide, dar acestea sunt infectate tipic cu un virus recombinant, de exemplu, virusul recombinant al vaccinei. Este preferată, în special, vaccina, atâta timp cât infectarea cu vaccină oprește exprimarea proteinelor din celula gazdă. Celulele gazdă preferate includ liniile celulare HeLa și plasmocitele. În sistemul prezent, aceasta înseamnă că E1 și E2 se
310 acumulează ca specii glicozilate principale în reticulul endoplasmatic gazdă. Deoarece rE1 și rE2 vor fi glicoproteinele predominante care au manoză terminală, ele vor fi ușor de purificat din celule prin utilizarea lectinelor, cum ar fi, de exemplu, aglutinina din *Galanthus nivalis* (GNA), care leagă resturile de manoză terminale.

Proteinele, care sunt, în mod natural, exprimate ca glicoproteine cu manoză
315 terminală, sunt relativ rare, în fiziologia maniferelor. În majoritatea cazurilor, o glico-
proteină de mamifere este terminată prin manoză, numai în cazul unui produs de tranziție pe parcursul glicozilării. Faptul că proteinele de acoperire ale virusului hepatitei C (HCV), exprimate recombinant conțin manoză terminală sau (într-un grad mai scăzut) N-acetil glucozamină, înseamnă că proteinele virusului hepatitei C și toți virionii
320 pot fi separați și parțial purificați din proteinele endogene utilizând lectine specifice pentru manoză terminală sau N-acetil glucozamină. Proteinele recombinante apar ca autentice și se consideră esențial identice cu proteinele de acoperire găsite în virionii maturi liberi sau sunt identice cu formele proteinelor de acoperire asociate celulelor. Astfel, se pot utiliza lectine, cum ar fi, de exemplu, GNA pentru proteinele cu manoză
325 terminală și WGA (aglutinina din germe de grâu) și echivalenții acestora pentru proteinele terminate cu N-acetil glucozamina. Se pot utiliza, de asemenea, lectine legate pe o fază solidă (de exemplu, o coloană Sepharoză^R-lectină) pentru a separa proteinele E1 și E2 din supernatanții culturilor celulare și din alte fluide, de exemplu pentru purificarea în timpul producției de antigeni utilizați la vaccinuri sau în
330 imunoanalize.

Pe de altă parte, se poate stabili o lectină convenabilă pentru izolarea protei-
nelor E1 și E2 sau a virionilor virusului hepatitei C din fluide sau din probele de țesuturi din subiecții suspectați de infecție cu virusul hepatitei C (HCV). Deoarece glicoprotei-
nele terminate cu manoză sunt relativ rare, un astfel de procedeu va servi pentru
335 purificarea proteinelor prezente în probă, printr-o reducere substanțială a materialelor de bază. Continuând legarea de lectină, proteina virusului hepatitei C (HCV), poate fi detectată utilizându-se anticorpi ai antivirului hepatitei C. Dacă virionii în întregime sunt prezenți, unii pot fi detectați alternativ în acizii nucleici din virusul hepatitei C (HCV), utilizându-se tehnicile PCR sau alte metode de amplificare ale acidului nucleic.
340 Îndreptate către regiunile genomice conservate ale virusului hepatitei C (de exemplu, regiunea necodificată 5'). Această metodă permite izolarea și caracterizarea diferitelor specii de virus al hepatitei C (HCV), fără a se lua în considerare deplasarea antigenică sau variația, cum ar fi, de exemplu, în cazurile în care o nouă specie nu este reactiv

încrucișată imunologic cu specia utilizată pentru prepararea anticorpilor. Există, de asemenea, multe alte căi avantajoase pentru recunoașterea, în mod unic a glicoproteinelor terminate în manoză, cu lectine speciale. De exemplu, se pot utiliza probe incubate, suspectate de contaminare cu virioni de tip virusul hepatitei C, HCV sau proteine cu biotină sau lectine avidin-marcate, prin precipitarea complexului lectină-proteină utilizând avidină sau biotină. Se poate utiliza, de asemenea, afinitatea lectinei pentru proteinele virusului hepatitei C (HCV), față de compușii menționați, la virionii pentru utilizare terapeutică, de exemplu, prin conjugarea unui compus antiviral la GNA. În plus, se pot utiliza lectine corespunzătoare pentru îndepărtarea glicoproteinelor cu manoză terminală, din fracțiunile serice sau din fracțiunile plasmatiche, reducându-se sau eliminându-se astfel riscul contaminării cu virusul hepatitei C (HCV). Se preferă, în prezent să se izoleze asialoglicoproteinele E1 și/sau E2 din lizatele celulare brute, prin incubarea cu o proteină imobilizată legată de manoză, în special, o lectină, cum ar fi de exemplu, ConA sau GNA. Celulele sunt lizate, de exemplu, prin distrugerea mecanică într-un mediu tampon hipotonic, după care are loc centrifugarea pentru prepararea unui lizat post-nuclear și prin continuarea centrifugării se obține o fracțiune brută de membrană microzomală. Fracțiunea de membrană brută este, apoi solubilizată într-un mediu tampon conținând un agent tensioactiv de tip detergent, cum ar fi, de exemplu, Triton X-100, NP-40 sau altele. Acest extract este clarificat apoi de macroparticule insolubile prin centrifugare și lizatul rezultat, clarificat este incubat într-o coloană cromatografică cuprinzând o proteină imobilizată legată de manoză, de preferință GNA, care se leagă pe un suport solid, cum ar fi, de exemplu, agaroză sau Sepharoză^R pentru o perioadă de timp suficientă pentru legare, care poate fi, de la 16 la 20 h. Suspensia este apoi aplicată pe coloană până ce E1/E2 începe să apară în eluat, apoi aceasta este incubată pe coloană pe o perioadă de timp suficientă pentru legare, cuprinsă între 12 - 24 h. Materialul astfel legat este apoi spălat cu o cantitate adițională de soluție tampon care conține un agent tensioactiv (de exemplu, Triton X-100, NP 40 și altele) și se eluează cu manoză pentru a se obține asialoglicoproteina purificată. Este de preferat să se efectueze eluarea numai până când proteina începe să apară în eluat - punct de eluare -, după care eluarea se oprește și coloana se echilibrează, timp de 2 - 3 h, înainte de a se începe eluarea proteinei. Se consideră că există timp suficient pentru a micșora gradul de obținere așteptat pentru agregatele mari de proteine. În cazurile în care E1 și E2 sunt exprimate la un loc în forma nativă (de exemplu, fără secționarea domeniului cu legături de membrană), o fracțiune substanțială de asialoglicoproteine apare sub formă de agregate E1 - E2. Când se face examinarea prin microscopie electronică, o porțiune semnificativă din aceste agregate apare ca particule sferice brute, având un diametru de aproximativ 40 nm, această dimensiune fiind de așteptat pentru virusul intact. Aceste particule par a fi particule subvirale cu autoasamblare. Este de așteptat ca aceste agregate să prezinte o structură cuaternară foarte similară structurii particulelor de virioni autentici pentru virusul hepatitei C și astfel se așteaptă ca ele să poată fi utilizate ca vaccinuri cu imunogenitate superioară.

Complecșii E1/E2 pot fi, în continuare purificați prin gel cromatografic, pe un mediu bazic, de exemplu, pe Fractogel-DEAE-Sepharoză^R. Utilizându-se gel cromatografic pe Fractogel-DEAE, se pot obține complecși E1/E2 de o puritate de, aproximativ 60...80 %. Se pot purifica în continuare prin tratament cu lizinprotează, deoarece E1 are reziduuri O-1 Lys. Prin tratamentul complexului cu lizinprotează, se distruge E2 și se permite separarea ușoară a E1. Specificitatea tisulară a virusului hepatitei C, împreună cu observația că glicoproteinele de acoperire a virusului hepatitei C sunt

terminate în manoză, sugerează că virusul utilizează receptorul de manoză sau
 receptorul asialoglicoproteinei (ASGR) în vederea câștigării pătrunderii în celulele
 395 gazdă. Receptorii de manoză se găsesc pe macrofage și celule hepatice sinusoidale,
 în timp ce ASGR se găsesc pe hepatocitele parenchimale. Astfel, ar fi posibil să se
 realizeze o cultură cu virusul hepatitei C, prin întrebuințarea celulelor gazdă care
 exprimă unul sau ambii acești receptori. Se mai pot utiliza, de asemenea, culturi de
 400 celule primare care exprimă receptorii în mod natural, utilizându-se condițiile în care
 receptorul este sau menținut sau poate fi transferat la o altă linie celulară, cum ar fi,
 de exemplu, HeLa, CHO, COS și altele, cu un vector prevăzut pentru exprimarea
 receptorului. Clonarea receptorului de manoză și transfectarea acestuia, precum și
 exprimarea în fibroblaști, a fost demonstrată de către M.E. Taylor și colaboratorii,
 405 J.Biol.Chem. (1990) 265: 12156-62. Clonarea și secvențarea ASGR este descrisă
 de către K.Drickamer și colaboratorii în J.Biol.Chem. (1984) 259: 770 - 78 și
 M.Spiess și colaboratorii în Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1985) 82: 6465-69;
 transfectarea și exprimarea funcțională a ASGR în celulele HTC la șobolani este
 descrisă de către M. Mc-Phaul și P. Berg în Proc. Nat.Acad.Sci. USA (1986) 83:
 8863 - 67 și M.Mc-Phaul și P.Berg în Mol.Cell.Biol. (1987) 7: 1841-47. Astfel, este
 410 posibil să se transfecteze unul sau ambii receptori în linii celulare corespunzătoare și
 să se utilizeze celulele care rezultă ca celule gazdă pentru propagarea virusului hepa-
 titei C în cultură. Trecherile seriale ale virusului hepatitei C în astfel de culturi ar avea
 ca rezultat dezvoltarea speciilor atenuate, corespunzătoare pentru utilizarea ca
 vaccinuri vii. Se mai pot utiliza, de asemenea, o serie de culturi celulare primare care
 415 exprimă în mod natural receptorul, utilizându-se condițiile în care receptorul este sau
 menținut sau poate fi transferat la o altă linie celulară, cum ar fi, HeLa, CHO, COS și
 altele, cu un vector prevăzut pentru exprimarea receptorului. Clonarea receptorului
 de manoză, transfectarea acestuia și exprimarea lui în fibroblaști, a fost demonstrată
 de către Taylor și colaboratorii, (vezi mai sus), în timp ce transfectarea și exprimarea
 420 ASGR funcționarea în celulele HTC la șobolani este descrisă de către McPhaul și
 colaboratorii, (vezi mai sus). În prezent este de preferat să se utilizeze o linie celulară
 imortalizată transfectată cu unul sau ambii receptori recombinanți.

Condițiile imunogene pot fi preparate conform metodelor cunoscute în literatura
 de specialitate. Compozițiile prezente cuprind o cantitate imunogenă de polipeptidă,
 425 cum ar fi, de exemplu, E1, E2 sau E1/E2 ca particule în aceste compoziții, de obicei
 combinate cu un vehicul acceptabil din punct de vedere farmaceutic, de preferință
 conținând în continuare, un adjuvant. Dacă se dorește un "cocktail", se poate folosi o
 combinație de polipeptide ale virusului hepatitei C (HCV), cum ar fi, de exemplu,
 antigenii E1 plus E2 amestecați pentru a se obține o eficacitate crescută. Se așteaptă
 430 ca particulele like-virus ale agregatelor E1/E2 să fie potrivite pentru un anumit antigen
 al vaccinului util. Compozițiile imunogene pot fi administrate la animale, fie pentru indu-
 cerea producerii de anticorpi, fie pentru a se constitui o sursă de anticorpi sau pentru
 a se induce o imunitate de protecție la animal.

Ca suporturi-vehicul acceptabile, din punct de vedere farmaceutic, pot fi utilizate
 435 oricare din suporturile care nu induc ele însele producerea de anticorpi nocivi pentru
 individul care primește compoziția. Ca suporturi convenabile tipice se pot întrebuința
 macromolecule mari, ușor metabolizabile, cum ar fi, proteine, polizaharide, acizi
 polilactici, acizi poliglicolici, acizi aminopolimerici, copolimeri de aminoacizi și particule
 de virusuri inactivate. Astfel de suporturi sunt bine cunoscute în referatele de speciali-
 440 tate. Adjuvanții preferați pentru a produce o mărire a eficacității compoziției, includ,
 dar fără să se ea acestea, hidroxidul de aluminiu (alum), N-acetil-muramil-L-threonil-D-

izoglutamina (thr-MDP) - așa cum este menționat, în **US 4605918** -, N-acetil-normuramil-L-alanil-D-izoglutamina (nor-MDP), N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutaminil-L-alanin-2-(1',2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE) și RIBI, care conțin trei componente extrase din bacterii, monofosforil lipid A, dimicolat trehaloza și scheletul cu pereți celulari (MPL+TDM+CWS) într-o emulsie 2 % squalen/Tween[®] 80. În plus, se pot utiliza și adjuvanți, ca, de exemplu, Stimulon (Cambridge, Bioscience, Worcester, MA). În continuare se mai pot utiliza adjuvanți ca Complete Freund's Adjuvant (CFA) și Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), pentru aplicații neumane și pentru scopuri de cercetare. 445

Compozițiile imunogene conțin, în mod tipic, suporturi acceptabile din punct de vedere farmaceutic, cum, ar fi de exemplu, apa, soluțiile saline, glicerolul, etanolul, etc. În plus, în aceste suporturi pot fi incluse substanțe auxiliare, cum ar fi, agenții de emulsionare sau agenții de umectare. 450

În mod tipic, compozițiile imunogene sunt preparate ca produse injectabile, fie sub formă de soluții lichide, fie ca suspensii; se pot prepara, de asemenea, forme sub formă solidă, atât pentru soluții sau suspensii. Prepararea poate fi, de asemenea, sub formă de emulsionare sau încapsulare în lipozomi pentru a se mări astfel efectul adjuvantului. 455

Compozițiile imunogene utilizate ca vaccinuri cuprind o cantitate efectivă imunologic de polipeptidă a virusului hepatitei C (HCV), ca și oricare alte componente menționate mai sus, dacă este necesar. "Cantitatea efectivă imunologică" reprezintă cantitatea administrată la un individ, fie într-o doză unică, fie ca serii parțiale și care este efectivă pentru tratament, așa cum s-a definit mai înainte. Această cantitate variază dependent de condițiile de sănătate și de condițiile fizice ale individului care trebuie tratat, de gruparea taxonomică a individului care trebuie tratat (de exemplu, primatele neumane, primatele, etc), dependent de capacitatea sistemului imunitar al individului care este tratat, pentru sintetizarea anticorpilor, dependent de gradul de protecție dorit, de formula vaccinului, de aprecierea situației medicale de către medicul care efectuează tratamentul, de specia de infectare cu virusul hepatitei C și de alți factori relevanți. Este de așteptat ca să poată fi determinată prin experimentări de rutină. 460 465 470

Agregatele E1/E2 cu autoasamblare pot servi, așadar, ca suport pentru vaccinuri la haptensul heterolog prezent (non-virusul hepatitei C), în același fel, ca în cazul antigenului de suprafață al hepatitei B (**EP 174444**). În această utilizare, agregatele E1/E2 prevăd un vehicul imunogen capabil să stimuleze un răspuns imun la haptensi sau la antigenii conjugați la agregat. Antigenul poate fi conjugat fie prin metode chimice convenționale, fie poate fi clonat în gena care codifică proteinele E1 și/sau E2 la locul corespunzător unei regiuni hidrofile a proteinei. 475

Compozițiile imunogene sunt, în mod convențional, administrate pe cale parenterală, tipic prin injectare, de exemplu, pe cale subcutanată sau pe cale intramusculară. Formulele adiționale convenabile pentru alte moduri de administrare includ formulele orale și supozitoarele. Dozajul pentru tratament poate fi sub formă de doză unică în serie sau, de asemenea, în serie de doze multiple. Vaccinul poate fi administrat în asociere cu alte agente de imunoreglare. 480

În continuare, se dau 4 exemple de realizare a invenției. 485

Exemplul 1. *Clonarea și exprimarea*

(A) Vectorii sunt construiți din plasmidele care conțin porțiunea 5' a genomului hepatitei C (HCV), așa cum este descris în **EP 318216** și **EP 388232**. Caseta virusului hepatitei C, HCV (S" B) conține Stul-BgIII fragment de acid dezoxiribonucleic DNA, care codifică porțiunea terminală 5' a proteinei de la Met 1 până la Leu 906, începând 490

de la nucleotida 63 cu referire la Met 1. Aceasta include partea interioară a proteinei (C), proteina E1 (care uneori se referă la S), la proteina E2 (care se referă așadar la NS 1) și porțiunea 5' a regiunii NS 2a. După exprimarea construcției, proteinele individuale C, E1 și E2 sunt produse prin procedee proteolitice.

495 Casa virusului hepatitei C, HCV (A/B) conține fragmentul de acid dezoxiribonucleic DNA ApaLI-BglII care codifică porțiunea terminală 5' a poliproteinei de la met 1 până la Leu 906, începând cu nucleotida 6 în raport cu Met 1. Aceasta include porțiunea interioară a proteinei (C), proteina E1 (uneori se referă la S), proteina E2 (se referă așadar la NS1) și o porțiune 5' din regiunea din regiunea NS2a. După exprimarea construcției, proteinele individuale C, E 1 și E2 sunt produse prin procedee proteolitice.

500 Caseta C - E (S/B) (o porțiune StuI-BamHI) conține terminația 5' dela Met 1, până la Ile 340 (o genă cu porțiunea BamHI). Exprimarea acestei casete are ca rezultat exprimarea lui C și uneori a proteinelor selecționate E1 (W1'). Porțiunea selecționată de la partea terminală 3' este o regiune hidrofobă care se crede că servește ca semnal de translocare.

505 Caseta NS 1 (B/B) (o porțiune BamHI-BglII) conține o porțiune mică 3' de proteină E1 (din Met 364) toate proteinele E2 și o porțiune NS2a (până la Leu 906). În această construcție, fragmentul E1 servește ca semnal de translocare.

510 Caseta TPA-NSI utilizează un lider activator (PA) plasmogenic din țesutul uman ca semnal de translocare, în loc de porțiunea 3' a proteinei E1. Caseta care conține o formă selecționată de proteină E2, de la Gly 406 până la Glu 661, în care porțiunea 3' terminală hidrofobă, se elimină.

515 Fiecare casetă care este inserată în vectorul pGEM>>Z (Promega)cu și fără secvența necodificată sintetică *beta*-globulina 5', pentru transcripție și translație, utilizează T7 și exprimarea reticulocitului la iepure, *in vitro*. Vectorii (rVV) virusului vaccinului recombinant sunt preparați prin inserarea casetelor în plasmidul pSC 11 (obținut prin experimentările Domnului B.Moss, NIH), după care urmează recombinarea cu virusul vaccinului, (conform descrierii lui Charkrabarty și colaboratorii, Mol.

520 Cell.Biol. (1985), 5:3403 - 09).
(B) O exprimare alternativă a vectorului se prezintă prin construcția realizată prin inserarea virusului hepatitei C, HCV (A/B) între porțiunile StuI și SpeI ale pSC% (obținute de către D-nul B.Mess, NIH), după care urmează recombinarea cu virusul de vaccinare (așa cum l-a descris Charkrabarty și colaboratorii, în Mol.Cell.Biol. (1985) 5:3403-09).

525 (C) Celulele HeLA S3 sunt colectate ca urmare a centrifugării, timp de 7 min, la 2000 rot/min, la temperatura camerei, în flacoane de centrifugare sterile de 500 ml capacitate (cu rotor Ja-10). Paletele sunt resuspendate la o concentrație finală de 2×10^7 celule/ml în aditie la mediu de cultură (Joklin în mediu modificat MEM Spinner + ser de cal + 5 % și gentamicina) ("mediu spiner"). Stocul brut de virusuri w(S C 59-virusul hepatitei C) sonicat, este adăugat la o multitudine de infecții ale celulelor, (pfu/celulă) și amestecul obținut este menținut sub agitare, la temperatura de 37°C, timp de 30 min. Celulele infectate sunt apoi transferate în flaconul de experimentare care conține 8 l mediu spinner și care se inoculează apoi, timp de 3 zile, la temperatura de 37°C.

535 Celulele din cultură sunt apoi colectate prin centrifugare și peletele sunt suspendate în mediu tampon (10 mM Tris-HCl, la pH=9,0, în 152 ml). Celulele sunt apoi omogenizate, utilizându-se un omogenizator Dounce de 40 ml capacitate (50 stokes) și nucleeele sunt peletate prin centrifugare (timp de 5 min, la o viteză de 1600 rot/min,

RO 115446 B1

la temperatura de 4°C, în rotor JA-20). Peletele nucleare sunt resuspendate în mediu tampon Tris (24 ml), reomogenizate și peletate din nou, după care se comasează toți supernatanții. 540

Lizatul comasat este divizat în alicoti de 10 ml și se supun sonicării de trei ori a câte 30 min, într-o pâlnie de sonicare la o putere medie. Lizatul sonicat (15 ml) este adus în 17 ml de conținut material de sucroză (36%) în tuburi de centrifugare SW28 și se centrifughează la 135000 rot/min, timp de 80 min, la 4°C, pentru peletarea virusului. Virusul peletat este resuspendat într-un mililitru de amestec tampon tris 545 (1mM tris HCl, la pH=9,0) și se coagulează, la temperatura, de -80°C.

Exemplul 2. Compararea produselor *in vitro* și *in vivo*

(A) proteinele E1 și E2 sunt exprimate ambele *in vitro* și *in vivo* și 35 S-Met este marcat utilizând vectorii, descriși în exemplul 1 de mai sus. Celulele BSC-40 și HeLa sunt infectate cu vectorii rVV pentru exprimarea *in vitro*. Atât mediul, cât și lizatele celulare sunt examinate pentru proteinele recombinat. Produsele au fost imunoprecipitate utilizându-se ser uman imunizat pentru virusul hepatitei C (HCV), în timp ce proteinele *in vitro* au fost analizate direct. Proteinele sunt analizate prin SDS-PAGE. 555

Sistemul de exprimare reticulocitic (pGEM3Z cu HCV(S/B) sau HCV(A/B) produce proteinele C, E1 și E2 având greutatea moleculare, de aproximativ 18kD, 35kD și respectiv 72 kD. Lizatele din celulele BSC-40 și HeLa sunt transfectate cu vectorii rVV și conțin HCV(S/B), HCV(A/B) sau C-E1(S/B) prezentând aceleași proteine. Deoarece sistemul reticulocitic nu prevede un proces Golgi eficient și deci, nu se prevede acidul sialic, atât *in vitro* cât și *in vivo*. Numai vectorul rVV care conține TPA-NB 1 are ca rezultat orice secreție extracelulară de E2, care prezintă o mobilitate modificată consistentă cu sialilare. 560

(B) HCV (S/B) este exprimat *in vitro* și este incubat cu o grupare de lectină biotinitată: GNA, PNA, WGA și ConA. După incubare complexii sunt colectați pe sfere acrilice de avidin, apoi sunt spălate, eluate cu un mediu tampon laemmli și analizate prin SDS-PAGE. Rezultatele arată că proteinele E1 și E2 se leagă de GNA și ConA, care indică prezența manozei. Legăturile GNA la grupările de manoză terminale au loc odată cu legarea ConA la orice manoză legată în poziția alfa. Absența legăturilor la SNA, PNA și WGA indică faptul că niciuna din proteine nu conține acid sialic, galactoză, N-acetilgalactozamină sau N-acetilglucozamină. 570

(C) Proteinele E1 și E2 radiomarcate sunt produse în celulele BSC-40 prin infectare cu ser imun față de HCV+. O jumătate din materialul imunoprecipitat este tratat până a doua zi cu neuraminidază pentru a se îndepărta urmele de acid sialic. După tratament, proteinele tratate și proteinele netratate sunt analizate prin SDS-PAGE. Nici o diferență semnificativă în mobilitate nu s-a observat, indicând lipsa sialilării *in vitro*. 575

(D) Proteinele E1 și E2 radiomarcate sunt produse în celulele BSC-40 prin infectare cu rVV conținând HCV (A/B) (w) /SC 59=HCV) și apoi are loc imunoprecipitarea cu ser uman HCV⁺ sau precipitarea prin biotinilarea lectinei GNA legată la particulele acrilice, și utilizându-se secvențele libere w/SC 11, de HCV, sub formă de control. Precipitatele au fost analizate prin SDS-PAGE. Datele au demonstrat că proteinele E1 și E2 au fost speciile majore de proteine cu terminații de manoză în celulele infectate w/SC 59-HCV. GNA a fost un antiser uman eficient în precipitarea proteinelor E1 și E2 din mediul de cultură celular. Componentul 25kD a fost observat, dar acesta pare a fi specific celulelor infectate cu vaccin. 580 585

Exemplul 3. Purificarea prin utilizarea lectinei

(A) Celulele HeLa sunt inoculate cu purificarea stocului de virusuri w/SCS9-HCV cu titru înalt, la o multiplicare de infecții de 5 pfu/celulă și amestecul este agitat, la temperatura, de 37°C timp, de 30 min. Celulele infectate sunt apoi transferate în flaconul de experimentare conținând mediu spinner 8 l și apoi sunt incubate timp de 3 zile, la temperatura de 37°C. Celulele sunt apoi colectate din nou prin centrifugare și resuspendate în soluție hipotonică (20 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 120 ml) pe gheață. Celulele sunt apoi omogenizate cu ajutorul unui omogenizator Duonce (50 stokes) și nucleeele sunt peletate prin centrifugare (5 min la 1600 rot/min, la 4°C, cu rotorul JA-20). Peletele sunt comasate, resuspendate în 48 ml tampon hipotonic, reomogenizate, recentrifugate, recomasate și congelate la -80°C. Supernatanții congelați sunt apoi, decongelați și fracțiunea de membrană microzomală a lizatului post-nuclear este izolată prin centrifugare, timp de 20 min, pe rotor JA-20 la o viteză de 13500 rot/min, la temperatura de 4°C. Supernatantul este apoi îndepărtat prin aspirație. Peletele sunt luate apoi cu 96 ml de amestec tampon conținând detergent (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 0,5 % Triton X-100, pH=7,5) și apoi se omogenizează (la 50 stokes). Produsul este clarificat prin centrifugare, timp de 20 min, la 13500 rot/min, la 4°C și supernatanții sunt colectați. Coloana de agaroză GNA 1 x 3 cm, 3 mg de sfere GNA per ml, 6 ml volumul stratului (Vector Labs, Burligame, CA) a fost pre-echilibrată cu un amestec tampon cu detergent. Proba de supernatant a fost aplicată pe o coloană cu recirculare într-o proporție de 1 ml /min, timp de 16...20 h, la temperatura de 4°C. Coloana a fost apoi spălată cu amestecul tampon cu detergent. Proteinele E1/E2 purificate sunt eluate cu *alfa*-D-manozid (0,9M în amestec tampon cu detergent), într-o proporție de 0,5 ml /min. Eluarea este oprită la apariția proteinelor E1/E2 în eluat și coloana este lăsată să se echilibreze din nou, timp de 2...3 h. Fracțiunile sunt analizate prin sistem cu pată Western și prin colorare cu argint. Fracțiunile de vârf sunt reunite și iradiate la ultra-violet pentru inactivarea oricărui virus de vaccină, rezidual.

(B) Agaroză GNA este utilizată pentru purificarea asialoglicoproteinelor E1 și E2 atunci când sunt sedimentate pe gradient de glicerol 20...60 %. Gradientele sunt fracționate și proteinele sunt analizate prin SDS-PAGE și prin sistemul de pătare Western. Petele sunt probate cu GNA pentru identificarea proteinelor E1 și E2. Rezultatele arată că sunt prezenți dimerii E1:E2, care se sedimentează în proporția așteptată (de exemplu, în proporția caracteristică a proteinei 110 kD). Agregatele mai mari ale proteinelor de acoperire a virusului hepatitei C sunt așadar aparente, de asemenea, homodimerii proteinelor E1 și E2 sunt aparenti. Proteina E2 pare a fi superior reprezentată într-un număr mai mare de specii față de proteina E1, așadar au fost, de asemenea, detectate specii discrete de E1:E2. Agregatele mai mari sunt sedimentate mai rapid față de markerul de tiroglobulină.

(C) După purificarea proteinelor E1 și E2 pe GNA-agaroză, acestea sunt sedimentate prin gradient de glicerol 20...60 % conținând 1mM EDTA. Fracțiunile sunt analizate prin SDS-PAGE, cu și fără *beta*-mercaptoetanol (*beta*ME). Nu s-a observat nici o diferență sau doar o mică diferență în abundența aparentei proteinelor E1 și E2 în prezența sau în absența *beta*-mercaptoetanolului (*beta*-ME), indicându-se astfel absența legăturilor bisulfurice între heterodimeri.

(D) Complecșii de proteine E1/E2 (aproximativ, 40 % puritate) sunt analizați într-un analizator de tip Coulter DM-4 submicroni particule). Materialul este detectat, la 20...60 nm.

(E) Complecșii de proteine E1/E2 (aproximativ, 40 % puritate) sunt analizați

prin microscopie electronică utilizându-se colorarea negativă cu acid fosfotungstic. Micrograful electronic demonstrează prezența particulelor, având aparență sferică și un diametru de, aproximativ 40 nm. Complecșii de E1/E2 sunt incubati cu ser imun uman HCV*, apoi sunt analizați prin EM cu colorare negativă. Au fost observați și complecșii anticorpilor conținând agregate mari și particule mici. 640

Exemplul 4. Purificarea cromatografică

(A) Materialul purificat pe lectina GNA preparat, așa cum s-a descris în exemplul 3 (0,5...0,8 ml) s-a diluat de 10 ori cu tampon A (20 mM Tris-Cl tampon, la pH=8,0, cu 1 mM EDTA) și s-a aplicat pe o coloană de 1,8 x 1,5 cm de Fractogel EMD DEAE-650 (EM Separations, Gibbstown, New Jersey, nr. Catalog 16883) echilibrată cu tampon A. Fracțiunea de proteină care conține proteinele E1/E2 este eluată cu același amestec tampon într-un gradient de 0,2 ml/min și fracțiunile de 1 ml sunt apoi colectate. Fracțiunile care conțin proteinele E1 și E2 (determinate prin SDS-PAGE) sunt comasate și depozitate, la temperatura, de -80°C. 645 650

(B) Materialul purificat în partea (A) de mai sus are o puritate de 60...80 %. Așa cum s-a estimat prin SDS-PAGE. Identificarea benzilor putative E1 și E2 a fost confirmată prin analiza secvențială la N-terminal după utilizarea tehnicii de transfer. În acest scop, Fractogel-DEAE este utilizat pentru purificarea materialului E1/E2, acest material fiind apoi redus prin adăugare de amestec tampon Laemmli (la pH=6,8, cu 0,06 mM tris, 2,3 % SDS, în glicerol de concentrație 10%, cu 0,72 M beta-mercaptoetanol) și apoi se fierbe, timp de 3 min. Proba este apoi încărcată pe gel de poliacrilamida 10%. După SDS-PAGE, proteina s-a transferat pe o membrană de difluorură de poliviniliden de 0,2 μm (PVDF) (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA). Benzile respective de proteină putative E1 și E2 sunt excizate din petele respective și supuse analizei acidului aminic N-terminal și astfel, nu este luată nici o măsură specială pentru prevenirea blocajului amino-terminal, în timpul preparării acestui material. Primele 15 cicluri demonstrează că proba E1 are o secvență de: 655 660

Tyr-Gln-Val-Arg-X-Ser-Thr-Gly-X-Tyr-His-Val-X-Asn-Asp, în timp ce secvența de E2 este: 665

Thr-His-Val-Thr-Gly-X-X-Ala-Gly-His-X-Val-X-Gly-Phe.

Secvența de aminoacid cuprinde date conform celor prevăzute din secvențele de aminoacid dezoxiribonucleic DNA corespunzătoare. Produsul E1/E2 purificat mai sus prin cromatografie de Fractogel-DEAE se crede a fi agregat, așa cum s-a evidențiat prin faptul că o mare cantitate de E1/E2 este coeluată în zona cu volum nul din coloana cromatografică de permutare a gelului BioSil TSK-4000SW. Aceasta arată, în condiții native, o cantitate semnificativă de complex E1/E2 cu greutatea moleculară, de cel puțin 800 kD. S-a observat, de asemenea, și materialul E1/E2 având o greutate moleculară, de aproximativ 650 kD. 670 675

Revendicări

1. Procedeu de obținere a asialoglicoproteinelor purificate provenind de la virusul hepatitei C, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde: dezvoltarea pe un mediu de cultură adecvat a unei celule-gazde transformată cu o genă structurală ce codifică o asialoglicoproteină a virusului hepatitei C selectată din grupul E1 și/sau E2, provocarea expresiei genei structurale în condiții care favorizează inhibarea sialilării; și izolarea asialoglicoproteinelor virusului hepatitei C din cultura de celule prin cuplarea cu o proteină care leagă manoza terminală. 680

- 685 2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** gena structurală, care codifică asialoglicoproteina virusului hepatitei C este legată de o secvență care determină un lider de secreție cu rolul de a dirija asialoglicoproteinele la reticulul endoplasmatic.
- 690 3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, condițiile care favorizează inhibarea sialilării cuprind expresia proteinelor cu o viteză suficientă pentru inhibarea transportului glicoproteinelor de la reticulul endoplasmatic la aparatul Golgi și prezența unei cantități suficiente dintr-un modulator de calciu, de preferință thapsigargin, care provoacă eliberarea proteinelor în reticulul endoplasmatic al celuleo-gazdă.
- 695 4. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** proteina de legare a manozei terminale este o lectină, de preferință aglutinina din *Galanthus nivalus*.
- 700 5. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** izolarea asialoglicoproteinelor virusului hepatitei C cuprind:incubarea compoziției obținută în primele două faze, timp de 1 h, pe o coloană cu lectina capabilă să lege manoză terminală imobilizată pe un suport și eluarea cu manoză a asialoglicoproteinelor virusului hepatitei C.
- 705 6. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se obțin asialoglicoproteine de tipul E1 sau E2 sau conținând o secvență de aminoacizi din domeniul E1 sau E2 a virusului hepatitei C.
- 710 7. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** asialoglicoproteinele virusului hepatitei C astfel obținute intră în componența unor compoziții ce conțin agregate E1/E2 purificate.
8. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** asialoglicoproteinele virusului hepatitei C astfel obținute sau agregatele lor sunt componente active ale unui vaccin, respectiv ale unui reactiv de imunodeterminare.

Președintele comisiei de invenții: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **ing. Petrea Dana Maria**

