

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 968**

51 Int. Cl.:
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04724588 .1**
96 Fecha de presentación: **31.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1608683**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra el complejo E1E2 del virus de la hepatitis C y composiciones farmacéuticas**

30 Prioridad:
01.04.2003 EP 03290822

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.04.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CÉDEX 13, FR
BIOMERIEUX SA**

72 Inventor/es:
**PETIT, Marie-Anne;
JOLIVET-REYNAUD, Colette y
TREPO, Christian**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 377 968 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos dirigidos contra el complejo E1E2 del virus de la hepatitis C y composiciones farmacéuticas.

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos conformacionales dirigidos contra el VHC y más particularmente a anticuerpos monoclonales. Asimismo, la invención se refiere a composiciones de partículas que pueden ser reconocidas por dichos anticuerpos, y a composiciones farmacéuticas que contienen los mismos. La invención también se refiere a partículas subvíticas de VHC o a partículas víricas completas con cubierta de VHC purificadas, y a los procedimientos para la preparación de las mismas.

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una causa principal de hepatitis crónica y cirrosis y puede conducir al carcinoma hepatocelular. Con aproximadamente 200 millones de personas en todo el mundo afectadas crónicamente por VHC, esta enfermedad ha emergido como un problema sanitario grave a escala global. El VHC es un virus ARN con cubierta que pertenece al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviridae*. Su genoma es un ARN monocatenario de 9,6 kb de polaridad positiva con una región 5' no traducida (UTR) que funciona como sitio interno de entrada ribosómica, un único marco de lectura abierta codificante de una poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos y una 3'UTR (Bartenschlager *et al.*, 2000). Esta poliproteína es cortada durante o después de la traducción por las peptidasas de la célula huésped, proporcionando proteínas estructurales, entre ellas la proteína nuclear y las glucoproteínas de cubierta E1 y E2, y por las proteasas víricas, generando las proteínas no estructurales (NS) 2 a 5B (Bartenschlager *et al.*, 2000). Análogamente a los virus ARN de cadena positiva relacionados, la replicación se produce pasando por un ARN intermediario de cadena negativa y resulta catalizada por las proteínas NS, que forman un complejo de replicasa asociado a la membrana citoplasmática.

Los bajos niveles de partículas de VHC presentes en las muestras de plasma de pacientes y la falta de un sistema de cultivo celular que proporcione soporte a una replicación del VHC o un ensamblaje de las partículas eficientes han dificultado la caracterización de las glucoproteínas asociadas al virión. Los conocimientos actuales sobre las glucoproteínas de cubierta del VHC se basan en ensayos de cultivo celular de la expresión transitoria con vectores de expresión víricos o no víricos. Estos estudios han demostrado que las glucoproteínas E1 y E2 interactúan formando complejos (revisado en Dubuisson, 2000). En presencia de detergentes no iónicos, se detectan dos formas de complejos E1E2: un heterodímero E1E2 estabilizado mediante interacciones no covalentes y los agregados heterogéneos unidos por enlaces disulfuro, que se considera que representan complejos incorrectamente plegados. Anteriormente, se han obtenido anticuerpos específicos de glucoproteínas de cubierta mediante inmunización con péptidos sintéticos o con antígenos recombinantes. Un anticuerpo monoclonal (mAb) reactivo con E2 sensible a la conformación (H2) que reconoce los heterodímeros E1E2 unidos no covalentemente que se consideran la forma plegación nativa del heterodímero de glucoproteína del VHC, sin embargo, no reaccionan con las partículas derivadas de suero positivas para ARN de VHC (Deleersnyder *et al.*, 1997). Además, el documento WO 92/07001 da a conocer anticuerpos que se han preparado mediante inmunización de ratones utilizando una preparación de partículas de VHC extraídas de chimpancés infectados; sin embargo, estos anticuerpos no han sido sometidos a ensayo con partículas de VHC naturales (es decir, derivadas de pacientes infectados). Además, el documento WO 00/05266 da a conocer anticuerpos preparados a partir de células B de pacientes infectadas; sin embargo, estos anticuerpos se han seleccionado según su capacidad para unirse a la proteína E2 recombinante. Por lo tanto, todos estos anticuerpos resultan de utilidad limitada para fines diagnósticos o para fines terapéuticos o profilácticos debido a que se han producido o seleccionado utilizando VHC no naturales, o partes de los mismos, y no se ha demostrado que interactúen con partículas de VHC naturales.

La falta de preparaciones de VHC que contengan partículas naturales de VHC con cubierta en cantidad y concentración suficientes es uno de los motivos de que no hayan podido obtenerse hasta ahora anticuerpos que puedan reconocer las partículas de VHC naturales. De hecho, los bajos niveles de partículas de VHC en las muestras de plasma han dificultado la caracterización y observación de este virus. Anteriormente se ha demostrado que los virus recuperados durante la etapa aguda de la infección a partir del plasma de pacientes naturalmente infectados presenta una densidad de flotación de aproximadamente 1,06 g/ml en sacarosa (Hijikata *et al.*, 1993). En contraste, los VHC recuperados de cultivos celulares tras la replicación *in vitro* presenta una densidad de flotación de 1,12 g/ml en sacarosa (Yoshikura *et al.*, 1996). Finalmente, los VHC recuperados de individuos infectados crónicamente presenta una densidad de flotación de aproximadamente 1,17 g/ml en sacarosa (Hijikata *et al.*, 1993). La baja densidad del virus derivado de suero se ha atribuido a su asociación con lipoproteínas de baja densidad séricas (Thomssen *et al.*, 1992). El virus de alta densidad se ha demostrado que se asocia a anticuerpos unidos al virus en complejos de antígeno-anticuerpo (Kanto *et al.*, 1995). A pesar de estos datos, todavía no se dispone de datos sobre la composición de las proteínas de estas diferentes poblaciones de VHC, ni se conoce si las fracciones de baja densidad (<1,0 g/ml) contienen cubierta, ARN y nucleocápside en forma de viriones completos.

Por lo tanto, un objetivo de la invención consiste en proporcionar anticuerpos que reaccionen con las partículas de VHC naturales.

Otro aspecto de la invención describe composiciones de partículas naturales del VHC, en cantidad y concentración suficientes para permitir la inmunización eficiente de los animales productores de anticuerpos.

Otro aspecto de la invención consiste en proporcionar composiciones de VHC específicas sin infectividad que puedan utilizarse como sustancias activas en composiciones farmacéuticas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo conformacional que puede unirse específicamente a la cubierta vírica del VHC natural.

La expresión "anticuerpo conformacional" se refiere a un anticuerpo que reconoce un epítipo que presenta una estructura tridimensional definida por su entorno molecular

La expresión "de unión específica" se refiere a que el anticuerpo se une a un epítipo que se encuentra en sustancialmente sólo uno de los elementos que forman la cubierta vírica del VHC natural, es decir, que no se produce sustancialmente ninguna unión del anticuerpo a elementos diferentes a los que forman la cubierta del VHC natural. Por ejemplo, la especificidad de unión del anticuerpo puede someterse a ensayo mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia, tales como experimentos de transferencia *western*, en los que se hacen migrar electroforéticamente muestras biológicas dentro de un gel, que después se transfieren a una membrana y se coincuban con dicho anticuerpo, realizando seguidamente la detección utilizando un anticuerpo secundario. Se dice que dicho anticuerpo es "de unión específica" a un compuesto diana contenido en dichas muestras biológicas en el caso de que sustancialmente la totalidad de las bandas electroforéticas detectadas contengan el compuesto diana o partes del mismo.

El acrónimo "VHC" se refiere a "virus de la hepatitis C"; se describe en particular en Choo *et al.* (1989, 1991). El VHC particularmente comprende ARN, una cápside formada de una proteína nuclear, y una cubierta que comprende lípidos y proteínas, particularmente glucoproteínas.

La "cubierta vírica del VHC" está formada de lípidos y proteínas, en particular glucoproteínas, tales como las proteínas E1 y E2 del VHC (Clarke, 1997).

El término "natural" se refiere al VHC, o partes del mismo, tal como se encuentra en muestras biológicas y posiblemente en su forma aislada y, en caso necesario, en su forma purificada a partir de muestras biológicas. Dichas muestras pueden ser de sangre, plasma o suero procedentes de pacientes infectados por VHC. En particular, el término "natural" se refiere al VHC, o partes del mismo, que no ha sido producido mediante métodos recombinantes o mediante la utilización de líneas celulares o animales, y difiere de los elementos del VHC descritos en Schalich *et al.* (1996), Blanchard *et al.* (2002) o en la patente WO 92/07001, por ejemplo.

La presente invención se refiere más particularmente a un anticuerpo conformacional que puede unirse específicamente a la proteína E2 del VHC natural.

La proteína E2 del VHC en particular se describe en Dubuisson (2000) y en Op De Beeck *et al.* (2001). Se produce en forma de poliproteína (3.012 aminoácidos) que se escinde, proporcionando E2 (aminoácidos 384 a 714).

La expresión "de unión específica" se refiere a que el anticuerpo se une a un epítipo, o a una parte del mismo, que se encuentra sustancialmente sólo en la proteína E2 del VHC. En particular, el anticuerpo no puede separarse de la proteína E2 de VHC en ensayos de competición, en los que el complejo de anticuerpo-E2 se presenta con otras proteínas.

La expresión "proteína E2 del VHC natural" se refiere a que la proteína se encuentra tal como se observa en muestras biológicas de pacientes infectados por VHC, en particular la proteína E2 natural de VHC no es una proteína recombinante.

La presente invención se refiere a un anticuerpo conformacional tal como se ha definido anteriormente, que puede neutralizar las infecciones por VHC en pacientes.

La expresión "que neutraliza la infección por VHC" se refiere a que el anticuerpo puede mejorar la salud de los pacientes infectados por VHC, tal como se pone de manifiesto, por ejemplo, en la reducción del VHC detectado en sangre, plasma o suero, o a que el anticuerpo puede prevenir en un individuo la infección por VHC.

La capacidad de neutralización de la infección por VHC de dicho anticuerpo puede someterse a seguimiento en modelos animales, tales como chimpancés o ratones, en particular ratones humanizados, que resultan infectados crónicamente por VHC, o que resultan infectados por primera vez por VHC en presencia de dicho anticuerpo. El anticuerpo sometido a seguimiento debe ser que puede inducir, según el caso, una reducción de la viremia relacionada con el VHC o la prevención de la infección por VHC.

La presente invención se refiere a un anticuerpo conformacional tal como se ha definido anteriormente que puede precipitar el complejo E1E2 del VHC bajo las formas covalentes o no covalentes del mismo.

El complejo E1E2 del VHC puede ser no covalente, es decir, que E1 y E2 se encuentran asociados por medio de enlaces débiles, tales como los enlaces hidrógeno, los enlaces iónicos, los enlaces de Van Der Waals o los enlaces hidrofóbicos, o covalentes, es decir, que E1 y E2 se encuentran asociados mediante enlaces covalentes, tales como enlaces disulfuro, por ejemplo. Las formas covalentes y no covalentes del complejo E1E2, en particular, se describen o se sugieren en Deleersnyder *et al.* (1997) y en Choukhi A. *et al.*, Journal of General Virology 80:3099-3107, (1999).

La expresión "de precipitación" se refiere a que el anticuerpo puede provocar que el complejo E1E2 del VHC se insolubilice. La precipitación puede producirse, por ejemplo, tal como se describe en Dubuisson y Rice (1996).

La presente invención se refiere a un anticuerpo conformacional tal como se ha definido anteriormente, que puede unirse específicamente a la proteína E1 del VHC natural.

La E1 del VHC en particular se describe en Dubuisson (2000) y en Op De Beeck *et al.* (2001). Se produce en forma de poliproteína (3.012 aminoácidos) que resulta cortada, proporcionando E1 (aminoácidos 192 a 383).

La expresión "de unión específica" se refiere a que el anticuerpo se une a un epítipo, o parte del mismo, que se encuentra sustancialmente en únicamente la proteína E1 del VHC. En particular, el anticuerpo no puede separarse de la proteína E1 del VHC en ensayos de competición, en los que el complejo anticuerpo -E1 se presenta con otras proteínas.

La expresión "proteína E1 del VHC natural" se refiere a que la proteína se encuentra tal como se observa en muestras biológicas de pacientes infectados por el VHC, en particular la proteína E1 del VHC natural no es una proteína recombinante.

La presente invención se refiere más específicamente a un anticuerpo conformacional que puede unirse específicamente a la proteína E1 del VHC natural, a la proteína E2 del VHC natural, y de precipitar el complejo E1E2 del VHC bajo sus formas covalentes o no covalentes.

La presente invención se refiere a un anticuerpo conformacional tal como se ha definido anteriormente, que puede unirse específicamente a un epítipo constituido por las tres secuencias siguientes:

aminoácidos 297 a 306 de la proteína E1 del VHC,
aminoácidos 480 a 494 de la proteína E2 del VHC,
aminoácidos 613 a 621 de la proteína E2 del VHC.

El anticuerpo según la invención puede unirse a:

- una molécula que presenta un péptido que comprende los aminoácidos 297 a 306 de la proteína E1 del VHC, correspondiente a la secuencia siguiente: RHWTTQGCNC (SEC ID nº 1); y/o
- a una molécula que presenta un péptido que comprende los aminoácidos 480 a 494 de la proteína E2 del VHC, correspondiente a la secuencia siguiente: PDQRPYCWHPKPC (SEC ID nº 2); y/o
- a una molécula que presenta un péptido que comprende los aminoácidos 613 a 621 de la proteína E2 del VHC, correspondiente a la secuencia siguiente: YRLWHYPCT (SEC ID nº 3).

La unión de dicho anticuerpo a por lo menos una de las secuencias anteriores puede ser examinada sintetizando un péptido que contiene cualquiera de las secuencias anteriores y examinando la capacidad de unión del anticuerpo a dicho péptido sintetizado mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, tal como ELISA O EIA por ejemplo.

El acrónimo "ELISA" significa enzoinmunoanálisis de adsorción.

El acrónimo "EIA" significa enzoinmunoanálisis.

La presente invención se refiere a un anticuerpo conformacional como se ha definido anteriormente, que puede unirse específicamente a un epítipo constituido por las tres secuencias siguientes:

aminoácidos 297 a 306 de la proteína E1 del VHC;
aminoácidos 480 a 494 de la proteína E2 del VHC;
aminoácidos 613 a 621 de la proteína E2 del VHC.

El anticuerpo según la invención puede unirse a una molécula que presenta un epítipo, comprendiendo dicho epítipo:

- un péptido que comprende los aminoácidos 297 a 306 de la proteína E1 del VHC, correspondiente a la secuencia siguiente: RHWTTQGCNC (SEC ID nº: 1); y
- 5 - un péptido que comprende los aminoácidos 480 a 494 de la proteína E2 del VHC, correspondiente a la secuencia siguiente: PDQRPYCWHYPPKPC (SEC ID nº: 2); y
- un péptido que comprende los aminoácidos 613 a 621 de la proteína E2 del VHC, correspondiente a la secuencia siguiente: YRLWHYPCT (SEC ID nº: 3).

10 La unión de dicho anticuerpo a un epítipo que comprende cada una de las secuencias anteriores puede someterse a ensayo mediante el ensayo de la capacidad de unión del anticuerpo a una molécula, en particular una proteína, que comprende la secuencia RHWTTQGCNC (SEC ID nº 1) y a una molécula, en particular una proteína, que comprende la secuencia PDQRPYCWHYPPKPC (SEC ID nº 2) y a una molécula, en particular una proteína, que comprende la secuencia YRLWHYPCT (SEC ID nº 3), mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia, tal como ELISA o EIA, por ejemplo.

La presente invención se refiere a un anticuerpo conformacional tal como se ha definido anteriormente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a que el anticuerpo se une sustancialmente a un solo epítipo, o a partes de dicho epítipo.

Un anticuerpo monoclonal puede obtenerse a partir de líneas celulares monoclonales, derivadas a partir de células inmortalizadas secretoras de anticuerpos, tales como hibridomas, por ejemplo.

Las líneas celulares monoclonales se derivan a partir del cultivo de una sola célula.

Puede producirse un hibridoma mediante fusión de una célula secretora de anticuerpo, tal como una célula B, con una célula inmortalizada, según Kohler y Milstein (1975) o según Butlin *et al.* (1978), por ejemplo.

Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo monoclonal tal como se ha definido anteriormente resulta secretado por el hibridoma depositado para el Tratado de Budapest en el CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, París, Francia) el 19 de marzo de 2003, bajo el número de acceso CNCM I-2983.

Dicho anticuerpo monoclonal en particular se une a la cubierta vírica del VHC natural, a la proteína E2 del VHC natural, a la proteína E1 del VHC natural, y puede precipitar el complejo E1E2 del VHC bajo sus formas covalentes o no covalentes, y puede unirse a un epítipo constituido por la totalidad de las secuencias anteriormente definidas. En particular en adelante se hace referencia a dicho anticuerpo monoclonal en la presente memoria como D32.10.

Según otro aspecto, un anticuerpo monoclonal tal como se ha definido anteriormente es secretado por el hibridoma depositado bajo el Tratado de Budapest en el CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, París, Francia) el 19 de marzo de 2003, bajo el número de acceso CNCM I-2982.

Dicho anticuerpo monoclonal en particular se une a la cubierta vírica del VHC natural y a la proteína E2 del VHC. Dicho anticuerpo monoclonal en particular se denomina en adelante D4.12.9.

La invención también se refiere a fragmentos o derivados de los anticuerpos según la invención. Los fragmentos de los anticuerpos de la invención en particular comprenden fragmentos Fab, F(ab')₂ o scFv (Fv de una cadena), que son bien conocidos por el experto en la materia. Los derivados de los anticuerpos de la invención comprenden, en caso apropiado, anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados pueden ser, por ejemplo, anticuerpos quiméricos en los que, en caso apropiado, partes de los anticuerpos según la invención se sustituyen por las partes correspondientes de anticuerpos humanos, tales como el fragmento Fc por ejemplo. Alternativamente, la región determinante de complementariedad (CDR) de los anticuerpos según la invención puede injertarse en anticuerpos humanos, tal como se describe, por ejemplo, en la patente US nº 5.824.307.

Según otra forma de realización, la invención se refiere a un hibridoma depositado bajo el Tratado de Budapest en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, París, Francia) el 19 de marzo de 2003, bajo el número de acceso CNCM I-2983.

Según otra forma de realización, la invención describe un hibridoma depositado bajo el Tratado de Budapest en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, París, Francia) el 19 de marzo de 2003, bajo el número de acceso CNCM I-2982.

Según otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa por lo menos uno de los anticuerpos mencionados anteriormente y un vehículo farmacéuticamente

aceptable.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable es, en particular, uno tal como se define en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Mack Publishing Co.

Pueden estar comprendidos otros compuestos, en particular compuestos antivíricos, en la composición anteriormente indicada, tal como otros anticuerpos anti-VHC y fragmentos o derivados de los mismos, interferones, inhibidores de ARN polimerasa, inhibidores de proteasa o inhibidores de helicasa.

La composición farmacéutica mencionada anteriormente puede administrarse en una única dosis o en múltiples dosis. En el caso de una única dosis, la composición puede comprender entre aproximadamente 0,1 mg de anticuerpo por kg de peso corporal y aproximadamente 1 g de anticuerpo por kg de peso corporal, en particular entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg. En el caso de múltiples dosis, la composición puede administrarse en una dosis de entre aproximadamente 0,1 mg de anticuerpo por kg de peso corporal al día y aproximadamente 1 g de anticuerpo por kg de peso corporal al día, en particular entre aproximadamente 1 mg/kg/día y aproximadamente 100 mg/kg/día.

Según otra forma de realización, la invención se refiere a la utilización de por lo menos uno de los anticuerpos tal como se han definido anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado al diagnóstico, a la prevención o al tratamiento de las infecciones por VHC.

Los anticuerpos según la invención pueden utilizarse para la detección de partículas víricas de VHC en muestras biológicas que pueden contener VHC. Dichas muestras pueden obtenerse de pacientes infectados por VHC o con riesgo de resultar infectados por VHC y comprenden en particular muestras de sangre, plasma o suero. Puede aplicarse con los anticuerpos de la invención cualquiera de los métodos bien conocidos por el experto en la materia para la detección de virus con anticuerpos, tales como ELISA o EIA.

El anticuerpo según la invención puede utilizarse para la preparación de un medicamento administrado en pacientes infectados o no por VHC, con el fin de neutralizar una infección por VHC. La neutralización de la infección por VHC puede realizarse mediante la prevención del contacto del VHC con las células diana, por ejemplo uniendo el anticuerpo a moléculas de la cubierta, tales como E1 o E2, que se unen a los receptores de membrana de las células diana, impidiendo así la unión de VHC y células diana.

El anticuerpo puede administrarse en pacientes infectados por VHC para impedir que las partículas víricas de VHC infecten las células, en particular los hepatocitos, o para estimular la captura de VHC recubiertos con dichos anticuerpos por parte de células del sistema inmunológico.

El anticuerpo puede, en particular, administrarse en pacientes que deben recibir un órgano de trasplante, en particular un hígado, antes, durante o después de la cirugía de trasplante, para neutralizar las partículas víricas de VHC que pueden encontrarse contenidas en el órgano trasplantado.

La invención también se refiere a una partícula vírica con cubierta que puede unirse a por lo menos uno de los anticuerpos tal como se han definido anteriormente.

La expresión "partícula vírica con cubierta" representa en particular un virión de VHC, o parte de un virión de VHC, que contiene una cubierta, comprendiendo la cubierta lípidos y/o proteínas, en particular glucoproteínas, asociadas en láminas.

La invención también se refiere a un anticuerpo que se une a una partícula vírica con cubierta que puede unirse a por lo menos uno de los anticuerpos tal como se han definido anteriormente.

Según otra realización, la invención describe una composición de partículas víricas de VHC derivadas a partir de muestras iniciales de sangre, plasma o suero humano, en la que la concentración de copias de ARN de VHC es entre aproximadamente 100 y 1.000 veces superior a la concentración de copias de ARN de VHC en las muestras iniciales de sangre, plasma o suero humano a partir de las que se ha derivado, y es en particular superior a aproximadamente 10^7 copias/ml.

La elevada concentración de las composiciones permite una inmunización eficiente de animales con dichas composiciones.

El ARN de VHC es, en particular, ARN genómico de VHC.

El contenido de ARN de VHC de una muestra puede medirse mediante RT-PCR, en particular mediante RT-PCR cuantitativa, con el aparato AmplicorTM HCV MonitorTM, Roche Diagnostics (Young *et al.*, 1993), por ejemplo.

Alternativamente, el contenido de ARN del VHC de una muestra también puede medirse utilizando la tecnología

NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos) (Damen *et al.*, 1999).

El contenido de ARN del VHC de una muestra puede expresarse en términos del número de copias de moléculas de ARN del VHC en dicha muestra, siendo equivalente una copia a una unidad internacional (UI).

El contenido de ARN del VHC de una muestra es indicativo de la cantidad de viriones de VHC contenidos en dicha muestra.

Una composición que contenga más de aproximadamente 10^7 copias/ml de ARN del VHC permite la inmunización eficiente de animales con dicha composición.

La invención más concretamente describe una composición tal como se ha definido anteriormente, en la que el número de copias de ARN del VHC es de entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^9 UI por mg de proteína.

El contenido de proteínas de la composición se evalúa mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia, y particularmente mediante el ensayo de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), tal como el ensayo de proteínas Biorad (Biorad Laboratories).

Dicha medida representa la actividad específica de la composición; es indicativa de la pureza de la misma; cuanto más alto es el número de copias de ARN del VHC por mg de proteína, más alta es la pureza de la composición que contiene VHC.

La invención describe además una composición tal como se ha definido anteriormente, en la que el volumen de dicha composición es de entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 10 ml.

Un volumen de composición de entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 10 ml corresponde a una composición tal como se ha definido anteriormente que contiene por lo menos 10^6 copias de ARN del VHC.

Dicha composición resulta útil para la inmunización de animales. Por ejemplo, la inmunización eficiente de un ratón requiere la administración de una composición de partículas víricas de VHC que contenga más de aproximadamente 10^6 copias de ARN de VHC, tal como se indica en los ejemplos.

Según otra forma de realización, la invención describe una partícula subvímica con cubierta de VHC aislada que sustancialmente no presenta ARN de VHC ni proteína nuclear de VHC.

El término "aislado" se refiere a que la partícula ha sido extraída de su entorno natural, en particular ha sido separada de otras partículas víricas de VHC o partes de las mismas que contienen ARN de VHC y/o proteína nuclear de VHC.

La expresión "sustancialmente sin ARN de VHC ni proteína nuclear de VHC" se refiere a que la solución que contiene la partícula subvímica anteriormente definida contiene menos de 10^4 UI/ml de ARN de VHC medidos con el aparato AmplicorTM HCV MonitorTM, de Roche Diagnostics (Young *et al.*, 1993), y menos de 1 pg/ml de proteína nuclear medido con el ensayo diagnóstico Ortho-Clinical (Aoyagi *et al.*, 1999).

La presencia de la cubierta puede evaluarse, por ejemplo, mediante un ensayo EIA o ELISA con el anticuerpo secretado por el hibridoma depositado en la CNCM bajo el número de acceso I-2983, en adelante denominado D32.10, o el anticuerpo secretado por el hibridoma depositado en la CNCM bajo el número de acceso I-2982, en adelante denominado D4.12.9.

La expresión "partícula subvímica de VHC con cubierta" se refiere a que la partícula sólo contiene sustancialmente la parte de cubierta del virión de VHC, es decir, lípidos y proteínas, en particular glucoproteínas, asociadas en láminas. Las partículas víricas de VHC aisladas hasta el presente contienen ARN de VHC y/o proteína nuclear de VHC.

La invención describe más concretamente una partícula subvímica de VHC con cubierta aislada tal como se ha definido anteriormente, en la que dicha partícula subvímica puede unirse a cualquiera de los anticuerpos indicados anteriormente.

La unión de las partículas subvímicas anteriormente indicadas a los anticuerpos de la invención puede evaluarse mediante varios métodos bien conocidos por el experto en la materia, tales como la inmunoprecipitación, ELISA, EIA o transferencia *western*, por ejemplo.

Según otra forma de realización, la invención describe una composición que comprende partículas víricas completas de VHC con cubierta purificadas, conteniendo dichas partículas víricas completas de VHC con cubierta purificadas, ARN de VHC, proteína nuclear de VHC y cubierta de VHC, las cuales pueden unirse a cualquiera de los anticuerpos indicados anteriormente.

La invención describe más particularmente una composición que comprende partículas víricas completas de VHC con cubierta naturales purificadas.

5 La expresión "partículas víricas completas de VHC con cubierta" se refiere a que los viriones de VHC contienen ARN genómico de VHC, proteína nuclear de VHC y cubierta de VHC. No se ha informado en la técnica anterior de una partícula vírica de VHC que contenga dichos tres componentes.

10 La presencia de ARN de VHC, proteína nuclear de VHC y cubierta de VHC puede evaluarse mediante la utilización de los métodos definidos anteriormente.

15 El término "purificado" se refiere a que la partícula vírica completa de VHC con cubierta indicada anteriormente se ha separado de otros compuestos, tales como partículas subvíricas de VHC con cubierta. En particular, puede evaluarse, por ejemplo mediante microscopía electrónica, que la composición contiene 90% menos partículas subvíricas de VHC con cubierta que las partículas víricas completas de VHC con cubierta.

20 La unión de la partícula vírica completa de VHC con cubierta anteriormente indicada a los anticuerpos según la invención puede evaluarse mediante varios métodos bien conocidos por el experto en la materia, tales como la inmunoprecipitación, ELISA, EIA o transferencia *western*, por ejemplo.

Según otra forma de realización, la invención describe un procedimiento para preparar una composición de partículas víricas de VHC, que comprende las etapas siguientes:

- 25 - por lo menos dos ultracentrifugaciones de una muestra que resulta de una plasmaféresis clarificada de un paciente infectado por VHC, con el fin de obtener un sedimento enriquecido en VHC,
- la resuspensión del sedimento enriquecido en VHC en una solución acuosa, con el fin de obtener una composición de partículas víricas de VHC.

30 Las ultracentrifugaciones se llevaron a cabo, por ejemplo, a una velocidad de entre aproximadamente 190.000 g y aproximadamente 220.000 g, preferentemente de 210.000 g, durante entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 horas, preferentemente durante 4 horas.

35 Las condiciones preferidas de centrifugación conducen a la precipitación de las partículas víricas, tales como las partículas víricas de VHC, mientras que otros compuestos contenidos en el plasma clarificado no precipitan.

El término "plasmaféresis" se refiere a que se ha filtrado la sangre del paciente para obtener plasma, mientras que el resto de la sangre se ha reinyectado en el paciente.

40 El término "clarificado" se refiere a que el plasma obtenido de la plasmaféresis se ha centrifugado a baja velocidad, en particular a 3.000 g, durante 30 minutos.

El volumen inicial de la plasmaféresis antes de la ultracentrifugación ventajosamente es de aproximadamente 1 litro.

45 Según otra forma de realización, la invención describe una composición de partículas víricas de VHC, tal como la obtenida según el procedimiento anteriormente indicado de preparación de una composición de partículas víricas de VHC.

50 Según otra forma de realización, la invención describe un procedimiento para preparar una composición de partículas subvíricas de VHC con cubierta que comprende las etapas siguientes:

- por lo menos dos ultracentrifugaciones de una muestra que resulta de una plasmaféresis clarificada de un paciente infectado por VHC con el fin de obtener un sedimento enriquecido en VHC,
- 55 - resuspensión del sedimento enriquecido en VHC en una solución acuosa,
- ultracentrifugación del sedimento enriquecido en VHC resuspendido en un gradiente de densidad de sacarosa con el fin de separar los elementos del sedimento enriquecido en VHC resuspendido en fracciones según su densidad,
- 60 - recuperación de las fracciones que no contienen sustancialmente ARN de VHC, sustancialmente nada de proteína nuclear de VHC y que contienen partículas que pueden unirse al anticuerpo monoclonal indicado anteriormente como D32.10 o D4.12.9, con el fin de obtener una composición de partículas subvíricas de VHC con cubierta.

65 La ultracentrifugación del sedimento enriquecido en VHC resuspendido en un gradiente de densidad de sacarosa

puede llevarse a cabo entre aproximadamente 190.000 g y aproximadamente 220.000 g, preferentemente a 210.000 g, durante entre aproximadamente 40 horas y aproximadamente 50 horas, preferentemente durante 48 horas; el gradiente de sacarosa puede ser ventajosamente de aproximadamente 10% a aproximadamente 60% p/p, de aproximadamente 20% a aproximadamente 50% p/p, de aproximadamente 25% a aproximadamente 45% p/p, o de aproximadamente 30% a aproximadamente 45% p/p.

Todas las fracciones obtenidas se sometieron a ensayo para la presencia de ARN de VHC, proteína nuclear de VHC y/o partículas que pueden unirse a D32.10 o a D4.12.9.

Se dice que las fracciones no contienen sustancialmente ARN de VHC en el caso de que el contenido de ARN de VHC medido mediante un Amplicor™ HCV Monitor™, Roche Diagnostics (Young *et al.*, 1993), sea inferior a aproximadamente 10^4 IU/ml.

Se dice que las fracciones no contienen sustancialmente proteína nuclear de VHC en el caso de que el contenido de proteína nuclear de VHC medido mediante el ensayo diagnóstico Ortho-Clinical (Aoyagi *et al.*, 1993) sea inferior a aproximadamente 1 pg/ml.

El anticuerpo monoclonal utilizado es en particular el anticuerpo monoclonal D32.10, que resulta secretado por el hibridoma depositado en la CNCM bajo el número de acceso I-2983.

Se dice que las partículas pueden unirse al anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente en el caso de que presenten un resultado positivo en el ensayo EIA siguiente:

Se recubren placas de poliestireno de 96 pocillos (Falcon; Becton Dickinson France S.A., Le Pont de Claix) con las diferentes fracciones diluidas de 10^{-1} a 10^{-4} . Las placas se incuban durante la noche a 4°C y después se saturan con tampón Tris-NaCl (TN) (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM) que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 5% (p/v). Se añade a cada pocillo mAb D32.10 diluido en una mezcla de tampón TN/BSA y suero humano normal (NHS) al 50% a una concentración de 5 µg/ml y se incuba durante 2 horas a 37°C. El anticuerpo unido se detecta con un fragmento F(ab')₂ conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO) de inmunoglobulinas antirratón (diluidas 1/5.000; Immunotech) y con ortofenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustratos. Se determinó la densidad óptica DO a 450 nm o a 490 nm con un lector de placas ELISA (MRX, Dynex). Los resultados se consideran positivos en el caso de que sean superiores al valor de corte, correspondiente a una media de los controles negativos multiplicada por 2,1.

Las fracciones recuperadas presentaban en particular una densidad en sacarosa de aproximadamente 1,13 a 1,15 g/ml.

Alternativamente, las fracciones se sometieron a ensayo en primer lugar para la presencia de partículas que pueden unirse a D32.10 y/o a D4.12.9; en el caso de que no se encontrase presente sustancialmente ninguna de dichas partículas, no se realizaba ningún otro ensayo; en el caso de que sí se encontrasen presentes dichas partículas, se llevaba a cabo el ensayo de ARN de VHC y/o de proteína nuclear de VHC.

Según otra forma de realización, la invención describe una composición de partículas subvíricas de VHC con cubierta tal como la obtenida según el procedimiento anteriormente indicado para la preparación de una composición de partículas subvíricas de VHC con cubierta.

Según otra forma de realización, la invención da a conocer un procedimiento para preparar una composición purificada de partículas víricas completas de VHC con cubierta, que comprende las etapas siguientes:

- por lo menos dos ultracentrifugaciones de una muestra que resulta de una plasmaféresis clarificada de un paciente infectado por VHC, con el fin de obtener un sedimento enriquecido en VHC,
- resuspensión del sedimento enriquecido en VHC en una solución acuosa,
- ultracentrifugación del sedimento resuspendido enriquecido en VHC en un gradiente de densidad de sacarosa con el fin de separar en fracciones según su densidad los elementos del sedimento resuspendido enriquecido en VHC,
- recuperación de las fracciones que contienen entre aproximadamente 5×10^5 y aproximadamente 10^6 UI de ARN de VHC por ml, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 pg de proteína nuclear de VHC por ml, y que contienen partículas que pueden unirse al anticuerpo monoclonal definido anteriormente como D32.10 o D4.12.9, con el fin de obtener una composición purificada de partículas víricas completas de VHC con cubierta.

La ultracentrifugación del sedimento resuspendido enriquecido en VHC en un gradiente de densidad de sacarosa puede llevarse a cabo entre aproximadamente 190.000 g y aproximadamente 220.000 g, preferentemente a 210.000 g, durante entre aproximadamente 40 horas y aproximadamente 50 horas, preferentemente durante 48

horas; el gradiente de sacarosa puede ser ventajosamente de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 60% p/p, de entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50% p/p, de entre aproximadamente 25% y aproximadamente 45% p/p, o de entre aproximadamente 30% y aproximadamente 45% p/p.

- 5 El contenido de ARN de VHC, el contenido de proteína nuclear de VHC y la capacidad de unión de las partículas se midieron tal como se ha mencionado anteriormente.

El anticuerpo monoclonal utilizado era en particular el anticuerpo monoclonal D32.10, que resulta secretado por el hibridoma depositado en la CNCM bajo el número de acceso I-2983.

- 10 La composición obtenida mediante dicho procedimiento contiene en particular partículas víricas completas de VHC con cubierta purificadas y en particular no presenta sustancialmente partículas subvíricas de VHC con cubierta. En particular, puede evaluarse mediante, por ejemplo, microscopía electrónica, que la composición contiene 90% menos partículas subvíricas de VHC con cubierta que partículas víricas completas de VHC con cubierta.

- 15 Las fracciones recuperadas presentan en particular una densidad en sacarosa de aproximadamente 1,17 a 1,21 g/ml, más particularmente de aproximadamente 1,17 a 1,20 g/ml, de aproximadamente 1,19 a 1,21 g/ml, de aproximadamente 1,17 a 1,19 g/ml, o de aproximadamente 1,19 a 1,20 g/ml.

- 20 Alternativamente, las fracciones en primer lugar se sometieron a ensayo para la presencia de ARN de VHC; en el caso de que se encontrasen presentes más de 10^5 copias/ml de ARN de VHC, se llevaba a cabo el ensayo de proteína nuclear de VHC; en el caso de que no se encontrasen presentes más de 50 pg/ml de proteína nuclear, se llevaba a cabo un ensayo de la presencia de partículas que pueden unirse a D32.10 y/o a D4.12.9; en el caso de que se encontrasen presentes menos de 10^5 copias/ml de ARN de VHC, no se lleva a cabo ningún otro ensayo.

- 25 Según otra forma de realización, la invención da a conocer una composición de partículas víricas completas de VHC con cubierta purificadas, tales como las obtenidas según el procedimiento correspondiente mencionado anteriormente.

- 30 La invención también describe un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma depositado en la CNCM bajo el número de acceso I-2983, que comprende las etapas siguientes:

- inmunización de un animal, en particular de un mamífero, con una composición de partículas víricas de VHC de la invención, o tal como la preparada según la invención, y recuperación de los anticuerpos generados,
- selección, entre los anticuerpos generados, de anticuerpos monoclonales según su capacidad de unirse a las partículas víricas de VHC contenidas en la composición anteriormente indicada de partículas víricas de VHC.

La composición partículas víricas de VHC puede obtenerse de la manera siguiente:

- por lo menos dos ultracentrifugaciones de una muestra resultante de una plasmáféresis clarificada de un paciente infectado por VHC con el fin de obtener un sedimento enriquecido en VHC,
- resuspensión del sedimento enriquecido en VHC en una solución acuosa, con el fin de obtener una composición de partículas víricas de VHC.

La selección de los anticuerpos generados puede llevarse a cabo utilizando un ensayo EIA indirecto tal como se ha indicado anteriormente, recubriendo las placas con la composición de partículas víricas de VHC de la invención.

- 50 Según otra forma de realización, la invención da a conocer un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma depositado en la CNCM bajo el número de acceso I-2982, que comprende las etapas siguientes:

- inmunizar un animal, en particular un mamífero, con una composición purificada de partículas víricas completas de VHC con cubierta de la invención, o preparada según la invención, y recuperar los anticuerpos generados,
- seleccionar, entre los anticuerpos generados, anticuerpos monoclonales para su capacidad de unirse a las partículas víricas completas de VHC con cubierta purificadas que se encuentran contenidas en la composición anteriormente indicada de partículas víricas completas de VHC con cubierta purificadas.

- 60 La composición purificada de partículas víricas completas de VHC con cubierta puede obtenerse de la manera siguiente:

- por lo menos dos ultracentrifugaciones de una muestra resultante de una plasmáféresis clarificada de un paciente infectado por VHC, con el fin de obtener un sedimento enriquecido en VHC,

- resuspensión del sedimento enriquecido en VHC en una solución acuosa,
- ultracentrifugación del sedimento resuspendido enriquecido en VHC en un gradiente de densidad de sacarosa, con el fin de separar en fracciones según su densidad los elementos del sedimento resuspendido enriquecido en VHC,
- recuperación de las fracciones que contiene entre aproximadamente 5×10^5 y aproximadamente 10^6 UI de ARN de VHC por ml, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 pg de proteína nuclear de VHC por ml, y que contienen partículas que pueden unirse al anticuerpo monoclonal definido anteriormente como D32.10 o D4.12.9, con el fin de obtener una composición purificada de partículas víricas completas de VHC con cubierta.

La etapa de selección puede realizarse tal como se ha indicado anteriormente.

Según otra forma de realización, la invención describe un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal dirigido contra el VHC, en particular partículas subvíricas de VHC con cubierta, que comprende las etapas siguientes:

- inmunizar un animal, en particular un mamífero, con una composición de partículas subvíricas de VHC con cubierta de la invención, o preparada según la invención, y recuperar los anticuerpos generados,
- seleccionar, de entre los anticuerpos generados, anticuerpos monoclonales según su capacidad de unirse a partículas subvíricas de VHC con cubierta contenidas en la composición anteriormente indicada de partículas subvíricas de VHC con cubierta.

La composición de partículas subvíricas de VHC con cubierta puede obtenerse de la manera siguiente:

- por lo menos dos ultracentrifugaciones de una muestra resultante de una plasmaféresis clarificada de un paciente infectado por VHC, con el fin de obtener un sedimento enriquecido en VHC,
- resuspensión del sedimento enriquecido en VHC en una solución acuosa,
- ultracentrifugación del sedimento resuspendido enriquecido en VHC en un gradiente de densidad de sacarosa, con el fin de separar los elementos en fracciones según su densidad del sedimento resuspendido enriquecido en VHC,
- recuperación de las fracciones que no contienen sustancialmente ARN de VHC, sustancialmente exentas de proteína nuclear de VHC y que contienen partículas que pueden unirse al anticuerpo monoclonal definido anteriormente como D32.10 o D4.12.9, con el fin de obtener una composición de partículas subvíricas de VHC con cubierta.

La etapa de selección puede realizarse tal como se ha indicado anteriormente.

La presente invención se refiere más particularmente a anticuerpos dirigidos contra las partículas subvíricas de VHC con cubierta de la invención.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa por lo menos un anticuerpo dirigido contra partículas subvíricas de VHC con cubierta y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según otra forma de realización, la invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa las partículas subvíricas de VHC con cubierta tal como se han definido anteriormente, o la composición que comprende las partículas subvíricas de VHC con cubierta tal como se han definido anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente, pueden añadirse a la composición farmacéutica adyuvantes, tales como los definidos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Mack Publishing Co.; los adyuvantes pueden ser, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund, sales de aluminio o hidróxido de aluminio.

La composición puede administrarse, por ejemplo, en una sola dosis que comprenda entre 1 mg y 1 g de partículas subvíricas de VHC con cubierta.

Según otra realización, la invención describe la utilización de las partículas subvíricas de VHC con cubierta definidas anteriormente, o de la composición que comprende las partículas subvíricas de VHC con cubierta definidas anteriormente, para inducir una reacción inmunológica contra dichas partículas subvíricas de VHC con cubierta o contra partículas víricas completas de VHC con cubierta definidas anteriormente.

La expresión "inducir una reacción inmunológica" se refiere a que las células B secretoras de anticuerpos dirigidos

contra las partículas víricas de VHC pueden activarse o a que las células T que destruyen células infectadas por VHC pueden activarse.

Según otra forma de realización, la invención da a conocer la utilización de las partículas subvíricas de VHC con cubierta definidas anteriormente, o de la composición que comprende partículas subvíricas de VHC con cubierta definidas anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado al diagnóstico, a la prevención o al tratamiento de las infecciones por VHC.

Las partículas subvíricas de VHC con cubierta pueden utilizarse para evaluar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el VHC en inmunoensayos según un método bien conocido por el experto en la materia, tal como EIA o ELISA.

Las partículas subvíricas de VHC con cubierta pueden utilizarse para la preparación de una vacuna contra la hepatitis C, en particular una vacuna terapéutica.

La expresión "vacuna terapéutica" se refiere a que la vacuna puede mejorar el estado de un paciente infectado por VHC, por ejemplo mediante la inducción de la producción de anticuerpos dirigidos contra el VHC.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A, 1B, 1C, 1D y 1E

Las figuras 1A, 1B, 1C, 1D y 1E representan electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) de lisados de anticuerpos precipitados de células marcadas con ^{35}S . Los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden, respectivamente, a los anticuerpos C9.19.16, C2.22.1, D32.10, D3.20.12, C7.24.19, C7.14.41 y C1.9.3. El acrónimo "MW" corresponde a un marcador de peso molecular. El tamaño de las bandas correspondiente al marcador de peso molecular, se presentan a la derecha del gel. Si resulta posible, las bandas se identifican a la izquierda del gel como E1, E2 o Ag (de "agregado").

La figura 1A representa un SDS-PAGE de lisados de anticuerpos precipitados de células de control marcadas con ^{35}S , bajo condiciones reductoras.

La figura 1B representa un SDS-PAGE de lisados de anticuerpos precipitados de células marcadas con ^{35}S que expresan proteína E1 de VHC, bajo condiciones reductoras.

La figura 1C representa un SDS-PAGE de lisados de anticuerpos precipitados de células marcadas con ^{35}S que expresan proteína E2 de VHC, bajo condiciones reductoras.

La figura 1D representa un SDS-PAGE de lisados de anticuerpos precipitados de células marcadas con ^{35}S que expresan proteína E1E2 de VHC, bajo condiciones reductoras.

La figura 1E representa un SDS-PAGE de lisados de anticuerpos precipitados de células marcadas con ^{35}S que expresan proteína E1E2 de VHC, bajo condiciones no reductoras.

Figura 2

La figura 2 representa la transferencia *western* de partículas víricas de VHC, utilizando el anticuerpo monoclonal D32.10, bajo condiciones no reductoras y reductoras. De izquierda a derecha, M representa un marcador de peso molecular, bajo condiciones no reductoras, indicándose el tamaño de sus bandas a la izquierda del gel (en kDa); el carril 1 representa la transferencia *western* de las partículas víricas de VHC, utilizando el anticuerpo monoclonal D32.10, bajo condiciones no reductoras; el segundo carril M representa un marcador de peso molecular, bajo condiciones reductoras; el carril 2 representa la transferencia *western* de 2,5 μg de partículas víricas de VHC, utilizando anticuerpo monoclonal D32.10, bajo condiciones reductoras; el carril 3 representa la transferencia *western* de 5 μg de partículas víricas de VHC, utilizando el anticuerpo monoclonal D32.10, bajo condiciones reductoras. A la derecha del gel, se indica el tamaño de varias bandas del carril 3 (en kDa), algunas correspondientes a la proteína E2 de VHC (60 y 68) o a la proteína E1 de VHC (34 y 31).

Figuras 3A y 3B

Las figuras 3A y 3B representan la transferencia *western* de partículas víricas de VHC sometidas a desglucosilación por la glucosidasa A (figura 3A) y por la endoglucosidasa H (figura 3B).

En la figura 3A, el carril M representa un marcador de peso molecular, indicándose el tamaño de tres de sus bandas (en kDa) a la izquierda del gel; los carriles 1, 2, 3 y 4 representan, respectivamente, las concentraciones de glucosidasa de 20, 10, 5 y 0 mU/ml. A la derecha del gel, se indican las posiciones de las proteínas E2 y E1 de VHC, así como la posición de una forma desglucosilada mayor de proteína E1 (E1*) y el tamaño (en kDa) de varias

bandas correspondientes a formas desglucosiladas de E1 o E2, así como la forma desglucosilada mayor de E2 (41*).

En la figura 3B, el carril M representa un marcador de peso molecular, indicándose el tamaño de cuatro de sus bandas (en kDa) a la izquierda del gel; los carriles 1 y 2 representan, respectivamente, un experimento de desglucosilación de control realizado sin endoglucosidasa H y un experimento de desglucosilación realizado en presencia de endoglucosidasa H. A la derecha del gel se representan las bandas principales correspondientes a las formas totalmente glucosiladas de E2 y E1 y a las formas desglucosiladas de E2 (50, 48, 46 y 42 kDa) y de E1 (28 y 24 kDa). Las formas desglucosiladas predominantes de E2 (50*) y E1 (28*) se señalan con un asterisco.

Figura 4

La figura 4 representa la caracterización de las fracciones obtenidas mediante centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa de una preparación de partículas víricas de VHC. Se midieron tres parámetros: el contenido de ARN de VHC, el contenido de proteína nuclear de VHC y la reactividad hacia el anticuerpo monoclonal D32.10. El eje horizontal representa los números de las fracciones sometidas a caracterización. El eje vertical izquierdo representa la concentración de ARN del VHC ($\times 10^5$ UI/ml) y una medida de la reactividad hacia D32.10 medida mediante EIA indirecta (DO a 450 nm). El eje vertical derecho representa la concentración de proteína nuclear de VHC (en pg/ml). La curva correspondiente a los puntos negros representa la reactividad de las fracciones hacia D32.10; la curva correspondiente a los triángulos blancos representa el contenido de proteína nuclear en las fracciones y las columnas con puntos representan los contenidos de ARN de VHC en las fracciones.

Figuras 5A, 5B y 5C

Las figuras 5A, 5B y 5C representan, respectivamente, fotografías de microscopía electrónica de transmisión de una preparación de partículas víricas de VHC, de una preparación de partículas víricas completas de VHC con cubierta y de una preparación de partículas subvíricas de VHC con cubierta.

En la figura 5A, la barra horizontal representa una escala de 200 nm de longitud. Los elementos circulares de mayor tamaño representan partículas víricas completas de VHC con cubierta y los elementos circulares de menor tamaño representan partículas subvíricas de VHC con cubierta.

En la figura 5B, la barra horizontal representa una escala de 50 nm de longitud. Los elementos circulares representan partículas víricas completas de VHC con cubierta.

En la figura 5C, la barra horizontal representa una escala de 50 nm de longitud. Los elementos circulares representan partículas subvíricas de VHC con cubierta.

Figura 6

La figura 6 representa la transferencia *western* de partículas víricas de VHC utilizando el anticuerpo monoclonal D4.12.9. El carril M representa un marcador de peso molecular, indicándose el tamaño de cuatro de sus bandas (75, 50, 37 y 25) en los márgenes izquierdo y derecho del gel. Los carriles 1 y 2 representan el resultado de una digestión de las partículas víricas de VHC por la glucosidasa A y por la endoglucosidasa H, respectivamente; los carriles 3 y 4 representan el resultado de una digestión proteolítica de partículas víricas de VHC por las proteasas tripsina y V8; el carril 5 representa el resultado de la lisis con NP-40, y en el carril 6 no se ha llevado a cabo ningún tratamiento previo. A la derecha del gel, se indican las dos formas principales de proteína E2 no digerida (68 y 48) (en kDa), y a la izquierda del gel, se representa la forma desglucosilada principal de E2 (E2*).

Figura 7

La figura 7 representa una caracterización basada en D4.12.9 de las fracciones obtenidas mediante centrifugación en un gradiente de densidad en sacarosa de una preparación de partículas víricas de VHC. Además de la reactividad de las fracciones frente a D4.12.9, también se midió el contenido de proteína nuclear de las fracciones. El eje horizontal representa los números de las fracciones sometidas a caracterización. El eje vertical derecho representa una medida de la reactividad a D4.12.9 mediante EIA (DO a 450 nm). El eje vertical izquierdo representa la concentración de proteína nuclear de VHC (en pg/ml). La curva correspondiente a los cuadrados negros representa la reactividad de las fracciones frente a D4.12.9; la curva correspondiente a los rombos negros representa el contenido de proteína nuclear de las fracciones.

Figuras 8A, 8B y 8C

Las figuras 8A, 8B y 8C representan la inmunorreactividad de tres péptidos biotinilados, que comprenden respectivamente los aminoácidos 290 a 317 (figura 8A), los aminoácidos 471 a 500 (figura 8B) y los aminoácidos 605 a 629 (figura 8C), frente a 55 sueros procedentes de individuos sanos (11 sueros, numerados T1 a T11 en el eje horizontal) y de pacientes infectados por VHC (44 sueros, numerados A1 a A44 en el eje horizontal). El eje vertical

representa la reactividad de los sueros frente a los tres péptidos medida mediante ELISA (DO a 492 nm x1.000). Las columnas blancas representan la reactividad de los sueros de individuos sanos y las columnas grises representan la reactividad de los sueros de los pacientes infectados. La línea horizontal representa un valor de corte máximo a partir del cual una respuesta sérica se considera positiva. En la figura 8A, el valor de corte es de 0,691; en la figura 8B, de 0,572, y en la figura 8C, de 0,321.

Figuras 9A y 9B

Se cuantificó la proteína nuclear de VHC mediante el ensayo de antígenos nucleares totales de VHC de Ortho Clinical Diagnostics (figura 9A) y se analizó mediante transferencia *western* (figura 9B) en el sedimento VHC-Fan y las fracciones del gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 1 indicado anteriormente (figura 9A). Todas las fracciones se sometieron a ensayo a una dilución de 1:2. El sedimento VHC-Fan se sometió a ensayo a las diluciones 1:25, 1:50 y 1:100, y se encontró que contenía 332 pg/ml. Todas las diluciones se prepararon con tampón TNE. El valor de corte era de 1,4 pg/ml (figura 9B). El sedimento VHC-Fan y las fracciones 4, 8, 12 y 13 del gradiente de sacarosa de 30% a 45% se sometieron a SDS-PAGE al 12,5%. Las proteínas nucleares de VHC se detectaron utilizando una mezcla de anticuerpos monoclonales antinúcleo, 7G12A8, 2G9A7 y 19D9D6 (5 µg/ml cada una). Los filtros se revelaron utilizando el sistema ECL Plus de Amersham. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares de los marcadores (M) en kilodaltons (kDa) y las proteínas nucleares del VHC se indican a la derecha.

Figura 10

El ARN de VHC se analizó mediante RT-PCR cuantitativa Ensayo Amplicor HCV Monitor versión 2.0 (Roche Diagnostics) en todas las fracciones del gradiente inicial de sacarosa de 10% a 60%. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se calcularon mediante la utilización de las unidades internacionales QS (IU) en cada PCR, que eran específicas para cada lote, y se expresan en IU de ARN de VHC/ml.

Figuras 11A y 11B

Análisis de microscopía electrónica (EM) de las partículas de VHC con cubierta derivadas de suero. El sedimento VHC-Fan (2 µg) se inmunoprecipitó mediante la utilización de MAb D32.10 (5 µg) (paneles a, b, c y d) o MAb irrelevante (panel e), y los inmunocomplejos tras sedimentar mediante ultracentrifugación se adsorbieron sobre rejillas y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% (pH 4,5). Las preparaciones se visualizaron utilizando un microscopio electrónico JEOL 100 CX (figura 11A). Las partículas variaban algo en su diámetro (expresado en nm) y el histograma se dibujo a partir de 156 partículas víricas (VPs). La distribución de los tamaños de partícula mostraba un pico centrado en 35 nm (figura 11B). Micrografías electrónicas. Las barras en los paneles a, b, c y e indican 50 nm.

Figuras 12A y 12B

Análisis mediante microscopía electrónica de partículas de VHC-Fan procedentes de los picos 1 (figura 12A) y 2 (figura 12B) del gradiente de sacarosa tras la inmunoprecipitación con D32.10, la adsorción sobre rejillas y la tinción (figura 12A). Se construyó el histograma a partir de 41 partículas víricas. La especie predominante (85,4%) en el pico 1 era una partícula esférica de un diámetro aproximado de 20 nm, denominada "partícula pequeña" (figura 12B). El histograma se construyó a partir de 89 partículas víricas. Las formas más prevalentes (77,5%) en el pico 2 presentaban un diámetro medio de aproximadamente 41 nm. El pico 2 aparentemente era algo más heterogéneo en cuanto a los tamaños, y consistía principalmente de partículas de 35 y 50 nm de diámetro, denominadas "partículas grandes". Barras, 50 nm.

Figura 13.

Marcaje indirecto con inmunoro de partículas de VHC con cubierta. Las rejillas de microscopía recubiertas con los complejos inmunológicos de D32-10 (sedimento de VHC, 20 µg; mAb de D32.10, 5 µg) se incubaron con una dilución 1:50 de partículas (10 nm) de oro coloidal conjugadas con IgG de cabra antirratón a modo de segundo anticuerpo. Según los impedimentos estéricos de IgG (aproximadamente 15 nm en la EM), únicamente unas cuantas partículas de oro pudieron identificar la unión de anticuerpo. No se observaron partículas de oro fuera de las partículas víricas. Las barras en todos los paneles indican 20 nm.

Figuras 14A, 14B, 14C y 14D

Las figuras 14A y 14B representan el resultado de la centrifugación isopícnica en un gradiente de densidad de sacarosa (10% a 60%) de sedimentos enriquecidos en VHC procedentes del aislado de VHC-L de genotipo 1b. La figura 14A representa la densidad (eje horizontal izquierdo, g/ml) y la reactividad de E1E2-D32.10 (eje vertical derecho, A_{490 nm}) de las fracciones (eje horizontal) obtenidas tras la centrifugación. La figura 14B representa la transferencia *western* de las fracciones 6, 8, 10, 12 y 14, utilizando el MAb de D32.10 anti-E1E2. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares de los marcadores (M) en kilodaltons (kDa) y las proteínas E1 y E2 de VHC

se indican a la derecha. Las figuras 14C y 14D representan el resultado de la centrifugación isopícnica en un gradiente de densidad de sacarosa (10% a 60%) de sedimentos enriquecidos en VHC procedentes del aislado de VHC-Fan de genotipo 1a/2a. La figura 14C representa la densidad (eje horizontal izquierdo, g/ml) y la reactividad de E1E2-D32.10 (eje vertical derecho, $A_{490\text{ nm}}$) de las fracciones (eje horizontal) obtenidas tras la centrifugación. La figura 14D representa la transferencia *western* de las fracciones 6, 8, 10, 12 y 14, utilizando el mAb D32.10 anti-E1E2.

Para el EIA, cada fracción se diluyó 1/10.000 (figuras 4A y 4C) y para la transferencia *western*, se utilizaron 5 µl por carril de las fracciones seleccionadas (figuras 4B y 4D). Se determinó la densidad de las fracciones mediante refractometría y se expresó en g/ml. Se determinó la absorbancia (A) a 490 nm. Los resultados del EIA se consideraron positivos en el caso de que fueran superiores al valor de corte, correspondientes a la media de los controles negativos (por lo menos tres valores) multiplicada por 2,1. Los filtros se revelaron utilizando el sistema ECL Plus de Amersham.

Figuras 15A, 15B y 15C

La centrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 1 (2 ml de 30%, 3 ml de 35%, 3 ml de 40%, 2 ml de 45%) del sedimento de VHC-Fan (figura 15A). Las partículas de los picos 1 (fracción 8) y 2 (fracciones 12 y 13) del gradiente de sacarosa (30% a 45%) se sometieron individualmente a una segunda centrifugación de equilibrio (figuras 15B y 15C, respectivamente). El pico 1 se centrifugó en un gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 2 (3 ml de 30%, 3 ml de 35%, 2 ml de 40%, 2 ml de 45%) (figura 15B). El pico 2 se centrifugó en un gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 3 (2 ml de 30%, 2 ml de 35%, 3 ml de 40%, 3 ml de 45%) (figura 15C). La densidad de las fracciones determinada mediante refractometría se expresa en g/ml. La reactividad de E1E2-D32.10 se analizó mediante EIA indirecta, tal como anteriormente.

Ejemplo 1. Obtención de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cubierta vírica del VHC natural

Preparación de partículas de virus VHC

Con el fin de obtener materiales víricos en abundancia, se llevó a cabo la purificación de partículas víricas de VHC mediante plasmaféresis. El paciente seleccionado había desarrollado hepatitis C activa crónica tras un trasplante parcial de hígado para una cirrosis vírica por virus C, y 12 meses después, mieloma múltiple asociado a hipergammaglobulinemia que había sido la causa para el intercambio de plasma. El paciente mostraba niveles anormalmente elevados de aminotransferasas séricas (ALT/AST) y presentaba un resultado positivo para anticuerpos anti-VHC. El paciente resultaba negativo para todos los marcadores de VHB y VIH. El contenido de ARN de VHC del material inicial era de 6×10^5 copias/ml (Amplicor™ HCV Monitor™, Roche Diagnostics, Meylan, Francia) y el genotipo 1b (ensayo INNOLIPA, Innogenetics, Gent, Bélgica).

La plasmaféresis clarificada se utilizó para preparar un sedimento enriquecido en VHC mediante dos ultracentrifugaciones sucesivas a 210.000 g durante 4 horas a 4°C. El sedimento final se resuspendió en 1 ml de tampón Tris-NaCl-EDTA (TNE) (Tris-HCl 20 mmol/l, pH 7,5, NaCl 100 mmol/l, EDTA mmol/l) (concentración: 240 veces) y se almacenó a -80°C. El contenido de ARN de VHC de este material era de 3×10^7 copias/ml (Monitor, Roche) y la concentración de proteínas, de 5 mg/ml (es decir, aproximadamente 10^7 copias de ARN de VHC por mg de proteína).

Preparación de hibridoma

Para la generación de anticuerpos monoclonales (MAb), se inocularon ratones BALB/c con 100 µg (10^6 copias de ARN de VHC) de material de VHC sedimentado en adyuvante de Freund completo, seguido 1 semana después por 100 µg de virus en adyuvante incompleto de Freund. Los tres ratones inmunizados desarrollaron títulos elevados de anticuerpos en suero contra VHC, detectados mediante un inmunoensayo enzimático indirecto (EIA). Tres semanas después, los ratones recibieron un refuerzo de 50 µg de virus en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Tras 5 días, se repitió la inyección y 3 días después, se extrajo el bazo para la fusión con células de mieloma X63 mediante el procedimiento descrito por Buttin *et al.* (1978). Los sobrenadantes de cultivo de hibridoma se cribaron para la presencia de anticuerpos específicos para VHC mediante EIA indirecta utilizando el inmunógeno como la fase sólida (5 µg/ml) y fragmento F(ab')₂ conjugado con peroxidasa de inmunoglobulinas antirratón (Amersham, Francia) como anticuerpo secundario de revelado (Petit *et al.*, 1987). El diluyente contenía 50% de suero humano normal (NHS) para eliminar la reactividad no específica dirigida contra las proteínas NHS posiblemente asociadas a partículas víricas de VHC. Los híbridos que proporcionaban la señal más fuerte ($P/N > 10$) contra VHC se clonaron a continuación nuevamente mediante dilución limitante y se determinó adicionalmente su especificidad. Se seleccionaron siete clones (C9.19.16, C2.22.1, D32.10, D3.20.12, C7.24.19, C7.14.41 y C1.9.3) y se propagaron cuatro (D32.10, C2.22.1, C9.19.16 y D3.20.12) mediante inyección en ratones BALB/c cebados con pristano para la producción de líquido ascítico, y después se purificaron mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado al 50% seguido de cromatografía de afinidad en sefarsa-proteína G (Pharmacia, Francia). Se determinó el isotipo mediante ELISA utilizando métodos conocidos por el experto en la materia. Los siete clones analizados proporcionaron anticuerpos del isotipo IgG1.

Caracterización de anticuerpos monoclonales

Se utilizó el EIA indirecto para evaluar la interacción de los anticuerpos monoclonales anteriormente indicados con las partículas víricas. Se recubrieron placas de 96 pocillos de poliestireno (Falcon; Becton Dickinson France S.A., Le Pont de Claix) con la preparación de VHC (1 mg de proteína por ml) diluida de 10^{-1} a 10^{-6} (correspondiente de 100 µg/ml a 1 ng/ml). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C y después se saturaron con tampón Tris-NaCl (TN) (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 5% (p/v). A cada pocillo se añadieron MAb D32.10 diluido en una mezcla de tampón TN/BSA y suero humano normal (NHS) al 50% a una concentración de 5 µg/ml y se incubó durante 2 horas a 37°C. El anticuerpo unido se detectó con el fragmento F(ab')₂ conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO) de inmunoglobulinas antirratón (diluido 1/5.000; Immunotech) y con ortofenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustratos. Se determinó la densidad óptica (DO) a 450 nm con un lector de placas ELISA (MRX, Dynex). Los resultados se consideraron positivos en el caso de que fuesen superiores al valor de corte, correspondientes a la media de los controles negativos multiplicada por 2,1. Los siete anticuerpos obtenidos no reconocieron las partículas víricas.

Con el fin de establecer la especificidad del polipéptido nativo de los mAb, se llevó a cabo inmunotransferencia utilizando el inmunógeno a modo de sondas antigénicas (Petit *et al.*, 1987). Se llevó a cabo una electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida (PAGE) en geles al 12,5% bajo condiciones reductoras (SDS al 2% + 2-ME al 5%). Tras la transferencia de proteínas a membranas de PVDF, se sometieron a ensayo los mAb (2 a 5 µg/ml) a modo de anticuerpos primarios, diluidos en NHS al 50%, y las IgG unidas se detectaron mediante incubación con fragmento (Fab')₂ conjugado con peroxidasa de inmunoglobulinas antirratón (diluido 1/10.000, IMMUNOTECH), como anticuerpo secundario. Las bandas se visualizaron mediante un sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL+) de Amersham.

Todos los mAb sometidos a ensayo excepto D3.10 proporcionaron reacciones negativas con polipéptidos de VHC bajo condiciones reductoras. Debe indicarse que los mAb no eran reactivos con albúmina sérica humana ni con las cadenas γ o μ de inmunoglobulinas (Ig), excepto C1.9.3 y C7.24.19, que reaccionaron débilmente con la IgG humana en el EIA (aproximadamente 5 veces el valor negativo).

La especificidad de polipéptido de los siete anticuerpos también se examinó mediante inmunoprecipitación. Las células HepG2 infectadas por recombinantes de virus Vaccinia que expresaban proteínas del VHC (E1, E2 o E1E2) se marcaron metabólicamente con ³⁵S-Translabel (ICN) tal como se ha descrito anteriormente (Dubuisson *et al.*, 1996). Las células se lisaron con NP-40 al 0,5% en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM y EDTA 2 mM. Los precipitados se trataron con tampón para muestras de Laemmli y se analizaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras (figura 1). Los anticuerpos monoclonales sometidos a ensayo no mostraron reactividad no específica dirigida contra componentes celulares, excepto C9.19.16 (>200 kDa), D3.20.12 (tres bandas intensas en 70, 50 y 46 kDa) y más débilmente, C2.22.1 (70, 50 y 46 kDa) y D32.10 (múltiples bandas muy débiles) (figura 1A, vector de control). Todos los anticuerpos inmunoprecipitaron específicamente E1 (figura 1B) y E2 (figura 1C), en el caso de que se expresasen las dos glucoproteínas de VHC separadamente, así como los heterodímeros E1E2 (figura 1D), en el caso de que se coexpresasen estas proteínas. Resulta interesante que el patrón era diferente tras la SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras (figuras 1D, 1E). Todos reconocieron los agregados E1E2 unidos mediante enlaces disulfuro, que se detectaron en la parte superior de los geles bajo condiciones no reductoras (figura 1E). Se descubrió que un mAb, D32.10, reaccionaba principalmente con agregados y también con complejo E1E2 maduro no unido covalentemente (figura 1E, condiciones no reductoras). Todos los mAb no reconocieron las proteínas E1 o E2 recombinantes desnaturalizadas expresadas en el sistema heterólogo mediante análisis de transferencia *western*, sugiriendo que reconocían epítomos conformacionales sobre las partículas víricas de VHC. En conjunto, estos resultados indican que estos mAb reconocen específicamente complejos E1E2 unidos mediante enlaces disulfuro, expresados en la superficie de partículas víricas de VHC derivadas de suero natural. Es altamente probable que reaccionen con un epítipo conformacional compartido por las proteínas E1 y E2. Se seleccionó para estudios posteriores el anticuerpo monoclonal D32.10, que interactúa con el complejo E1E2 bajo su forma covalente o no covalente.

Mapeado de antígenos del anticuerpo monoclonal D32.10

Con el fin de someter a ensayo la especificidad de tipo de VHC de D32.10, se llevó a cabo un EIA indirecto, siguiendo el procedimiento ya descrito, con cuatro preparaciones de VHC diferentes (1 mg de proteína por ml) diluidas de 10^{-1} a 10^{-6} (correspondiente a 100 µg/ml a 1 ng/ml). Además de la preparación de inmunógeno VHC, se utilizó una preparación obtenida del mismo paciente, así como dos otras preparaciones obtenidas de dos pacientes diferentes con hepatitis C crónica, encontrándose que uno de los pacientes portaba dos genotipos diferentes en suero: HCV1a y HCV2a. Se encontró que D32.10 podía reconocer las cuatro preparaciones de VHC, indicando de esta manera que podía reconocer determinantes no restringidos al genotipo 1b del inmunógeno.

Con el fin de evaluar la especificidad de polipéptido nativo del D32.10 se llevó a cabo un análisis de transferencia *western*. Se utilizó un sedimento enriquecido en VHC no tratado como sonda antigénica, a diferentes concentraciones, variando de 0,1 a 1 mg/ml. El antígeno se sometió a electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-

poliacrilamida (SDS-PAGE) en geles al 12,5% bajo condiciones reductoras o no reductoras (SDS al 2% $\pm$ 2-mercaptoetanol (2-ME) al 5%). Tras la transferencia de proteínas a membranas de PVDF, se llevó a cabo una inmunotransferencia utilizando mAb D32.10 (2 a 5 μ g/ml) como anticuerpo primario, diluido en NHS al 50%. A continuación, se detectaron las IgG de ratón unidas mediante incubación con fragmento (Fab')₂ conjugado con peroxidasas de inmunoglobulinas antirratón (diluidas 1/10.000, DAKO) como anticuerpo secundario. Las bandas de proteína se visualizaron mediante un sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL+) de Amersham. La digestión con glucosidasa se llevó a cabo tal como se ha sido descrito anteriormente por Sato *et al.* (1993) con viriones de VHC circulantes. El sedimento enriquecido en VHC (VHC-L, 4 μ g) se trató con 5, 10 ó 20 mU/ml de glucosidasa A (péptido-N-glucosidasa A o PNGasa A, Roche) en tampón de citrato/fosfato 100 mM (pH 6,0) durante 18 horas a 37°C. La desglucosilación de las partículas víricas de VHC purificadas también se llevó a cabo mediante incubación durante la noche a 37°C en tampón de acetato sódico 50 mM (pH 5,5) que contenía endoglucosidasa H (endo H, 5 mU/ μ l de Roche), ditiotretol (DTT) 20 mM y Triton X100 al 0,1%. La digestión de control se llevó a cabo utilizando las mismas condiciones que para la digestión con PNGasa A o la digestión con endoH, excepto en que se omitió el enzima. A continuación, las muestras se trataron con tampón para muestras de electroforesis que contenía agente reductor y se analizaron mediante SDS-PAGE.

Los resultados del experimento de transferencia *western* se presentan en la figura 2. Al analizar dos concentraciones de la misma muestra (2,5 y 5 μ g, carriles 2 y 3, respectivamente) bajo condiciones reductoras (SDS al 2%/2-ME al 5%), mAb D32.10 reconoció una banda mayor de 68 kDa y otra banda de 31 kDa, correspondiente a E2 y E1, respectivamente. Sin embargo, bajo condiciones no reductoras, mAb 32.10 reconoció complejos unidos mediante enlaces disulfuro recuperados en la parte superior del gel (>200 kDa). Estas bandas de alto peso molecular (figura 2, carril 1) muy probablemente corresponden a complejos E1E2 heterodiméricos.

Se ha demostrado la presencia de cadenas sacáridas de tipo complejo unidas mediante asparaginas, sobre la superficie de los viriones nativos de VHC (Sato *et al.*, 1993); de esta manera se examinó la capacidad de mAb D32.10 de reconocer proteínas específicas de VHC tras el tratamiento de la preparación de VHC con glucosidasa (PGNAasa A) a diferentes concentraciones (20, 10 y 5 mU/ml). Tal como se muestra en la figura 3A (carriles 1, 2 y 3, respectivamente), D32.10 reaccionó con formas desglucosiladas de E1, especialmente la especie de 25 kDa, que se acumuló a la concentración más alta del enzima. Aunque los productos relacionados con E1 podían detectarse claramente con D32.10 tras la desglucosilación, los productos relacionados con E2 no pudieron identificarse claramente tras el tratamiento. La digestión con endoglucosidasa H (endoH) permitió investigar la sensibilidad de los complejos E1E2 expresada sobre partículas víricas de VHC naturales al corte por endoH. Tal como se muestra en la figura 3B, se observó un desplazamiento del peso molecular para las dos proteínas, tanto para E2 (de 68 a 42 kDa) como E1 (de 34 a 24 kDa), sugiriendo que E1 y E2 presentan una glucosilación compleja en partículas víricas de VHC nativas derivadas de suero, explicando la resistencia parcial a endoH, tal como una mezcla de glicanos complejos resistentes a endoH y formas sensibles.

Mapeado de epítomos de D32.10

a. Cribado de una biblioteca de péptidos

Con el fin de caracterizar adicionalmente los epítomos reconocidos por el mAb D32.10, el anticuerpo se utilizó para cribar una biblioteca de expresión fágica de dodecapéptidos.

Se obtuvo un kit de biblioteca de péptidos de expresión fágica Ph.D.-12TM de New England BioLabs Inc. Ésta son péptidos 12-meros combinatoriales fusionados con la proteína de cubierta menor (pIII) del fago M13. Los péptidos 12-meros expresados se expresan en el extremo N-terminal de pIII. La biblioteca está constituida por aproximadamente $1,9 \times 10^9$ secuencias electroporadas, amplificadas una vez para rendir aproximadamente 20 copias de cada secuencia en 10 μ l del fago suministrado. Se llevaron a cabo tres ciclos de selección por afinidad ("biopanning") siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se acoplaron 10 μ g de mAb D32.10 biotinilado a una placa de Petri de poliestireno de 35 mm (Falcon) recubierta con 40 μ g de estreptavidina. La placa se incubó durante la noche a 4°C y se lavó seis veces con Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (TBS) que contenía Tween-20 al 0,5% (TBS-T). En la primera ronda de selección, se dejó que 4×10^{10} fagos de la biblioteca inicial reaccionasen con las IgG unidas a la placa, durante 4 horas a 4°C bajo agitación por balanceo. Los fagos no unidos se eliminaron mediante lavados repetidos con TBS-T. Los fagos unidos se eluyeron a continuación de la placa con 400 μ l de tampón de elución (HCl 0,1 N, pH ajustado a 2,2 con glicina, BSA 1 mg/ml). Tras neutralizar con 75 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 9,1, los fagos eluidos se amplificaron a continuación mediante infección de 20 ml de una dilución 1:100 de un cultivo de durante la noche de *E. coli* ER2537 (células de cepa recA⁺), según se recomienda en el manual de instrucciones. El cultivo se incubó durante 4,5 horas a 37°C bajo agitación vigorosa. Los sobrenadantes se obtuvieron y se precipitaron con polietilenglicol (PEG) tal como se ha descrito anteriormente (Scott *et al.*, 1990). En las segunda y tercera rondas de selección, 20% de los fagos amplificados de la ronda anterior se preincubaron durante la noche a 4°C con el mAb D32.10 biotinilado a la concentración final de 10 y 1 nM, respectivamente, antes de añadirse a la placa de Petri de poliestireno de 35 mm recubierta con 10 μ g de estreptavidina. El procedimiento a continuación era idéntico al de la primera ronda. Los fagos del tercer eluido de biopanning se clonaron y se amplificaron a continuación para la secuenciación y el inmunoanálisis de ADN.

Para la secuenciación del ADN, se preparó ADN monocatenario a partir de los fagos purificados tal como se describe en Sambrook *et al.* (1982). Se determinó la secuencia de nucleótidos de las inserciones de gen III siguiendo el método modificado de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) con un secuenciador de ADN de Applied Biosystems (modelo 377A) utilizando el kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer). La secuenciación cíclica se llevó a cabo con un cebador 5'-HO-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-OH-3' (SEC ID nº 4) correspondiente a la secuencia génica de pIII. La secuencia de aminoácidos de la inserción se dedujo a partir de la secuencia de nucleótidos.

Para la ELISA de los fagos del sobrenadante, se recubrieron filas de pocillos de la placa ELISA con 100 µl de mAb D32.10 o un mAb irrelevante a la concentración final de 100 µg/ml en tampón NaHCO₃ 0,1 M (pH 8,6). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C y después se bloquearon con tampón NaHCO₃ 0,1 M (pH 8,6) que contenía 5 mg/ml de BSA. Tras incubación durante 2 horas a 4°C, las placas se lavaron seis veces con TBS que contenía Tween al 0,5%. Se añadieron diluciones en serie de cuatro veces de cada clon fágico a cada pocillo de la placa de microtitulación en un volumen final de 100 µl de TBS-T, partiendo de 10¹² viriones en el primer pocillo de una fila y finalizando con 2x10⁵ viriones en el pocillo 12º. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente bajo agitación y después se lavaron seis veces con TBS-T, tal como anteriormente. Los fagos unidos se detectaron en un ensayo de tipo sándwich utilizando un mAb anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante a una dilución de 1:5.000 (Pharmacia). Las placas se revelaron utilizando un kit de color comercial (bioMérieux) que contenía OPD y H₂O₂. Tras 10 minutos de incubación, las placas se leyeron a 492 nm con un lector de placas ELISA. Para cada dilución de clon fágico, los resultados se expresan como la diferencia entre el valor obtenido con el mAb anti-VHC sometido a ensayo y el valor obtenido con el mAb irrelevante. A continuación, se confirmaron los resultados mediante ensayo de diluciones óptimas de los clones inmunorreactivos por triplicado.

Para el análisis de las secuencias, se compararon las secuencias de aminoácidos de los péptidos con las secuencias de las proteínas E1 y E2 de VHC mediante la utilización del programa Mac Vector, versión 4.5 (Kodak). Básicamente se detectaron las regiones de similitud más elevada con el programa LFASTA, que busca tentativamente las mejores identidades locales (Pearson y Lipman, 1988).

Tras las tres rondas de selección, se encontró en el eluido 4% de los fagos iniciales, indicando la amplificación de los fagos unidos específicamente. De esta manera, se aislaron aleatoriamente 88 clones, se secuenció el ADN de los mismos y se dedujeron las secuencias de aminoácidos de las inserciones. Se obtuvieron cuarenta y ocho secuencias diferentes y se encontraron algunas de ellas en varios ejemplos. Sin embargo, en un ensayo ELISA para su inmunorreactividad con D32.10, ninguna de ellas proporcionó una señal positiva que indicaba que la afinidad de unión era excesivamente baja para resultar detectable. Se compararon las secuencias de los 48 clones con las secuencias de E1 y E2 de VHC. Cinco y tres secuencias presentaban similitudes con residuos de E1 situados en la región 292-305 y en la región 347-356, respectivamente (se indican las similitudes en negrita en la Tabla 1), mientras que 7, 4 y 2 secuencias compartían similitudes con residuos de E2 situados en las regiones 481-501, 610-631 y 685-698, respectivamente (se indican las similitudes en negrita en la Tabla 2).

Tabla 1

E1 (289-307)	QLFTFSPRRHWTTTQGCNCS (SEC ID nº: 5)
Clon 1	SPLRHYELPLIQ (SEC ID nº: 6)
Clon 2	WPHNHSTHSRTH (SEC ID nº: 7)
Clon 3	FPKYHPRFHKHA (SEC ID nº: 8)
Clon 4	SQRSRHWHDVDPK (SEC ID nº: 9)
Clon 5	TSQPRWHQKPAT (SEC ID nº: 10)
E1 (343-363)	AILDMIAGAHWGVLAGIAYFS (SEC ID nº: 11)
Clon 6	WKMPRATDWNLR (SEC ID nº: 12)
Clon 7	HWGNHSHKSHQQR (SEC ID nº: 13)
Clon 8	WHRTPSTLWGVI (SEC ID nº: 14)

Tabla 2

E2 (481-501)	DQRPYCWHYPPKPCGIVPAKS (SEC ID nº: 15)
Clon 9	WHKLPGHPRTV (SEC ID nº: 16)
Clon 4	SQRSRHWHDVDPK (SEC ID nº: 9)
Clon 10	TFAWHKPRVNLG (SEC ID nº: 17)
Clon 11	TSQPRWHQKPAT (SEC ID nº: 10)
Clon 12	HSSWYIQHFPL (SEC ID nº: 18)
Clon 13	FPAHPLRLPSL (SEC ID nº: 19)
Clon 8	WHRTPSTLNGVI (SEC ID nº: 14)
E2 (610-631)	DYPYRLWHYPCTINYTIFKIRM (SEC ID nº: 20)
Clon 1	SPLRHYELPLIQ (SEC ID nº: 6)
Clon 14	WHWNKPIIRPPLR (SEC ID nº: 21)
Clon 15	QPYKLQAAATLY (SEC ID nº: 22)
Clon 6	WKMPRATDWNLR (SEC ID nº: 12)

Tabla 2 (continuación)

E2 (685-698)	LSTGLIHLHQNIVD (SEC ID nº: 23)
Clon 16	HLYHKNRNHAIY (SEC ID nº: 24)
Clon 17	WSPGQQLHNST (SEC ID nº: 25)

b. Síntesis de péptidos

Con el fin de evaluar la significación de dichas diferentes localizaciones en ambas secuencias de E1 y E2, las regiones 291-315 y 347-356 de E1, así como las regiones 473-498, 607-627 y 686-697 de E2, se reprodujeron en forma de pentadecapéptidos sintéticos solapados aunque desalineados por uno y se sometieron a ensayo para su inmunorreactividad con D32.10.

Se llevó a cabo la síntesis simultánea de diferentes secuencias de péptidos sobre una membrana de nitrocelulosa utilizando la química del aminoácido 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Frank, 1988).

Se generó cada péptido en cantidades nanomolares adecuadas para la detección inmunológica. Se analizó la reactividad de los anticuerpos con los péptidos unidos a membrana mediante un inmunoensayo colorimétrico indirecto, tal como se ha descrito anteriormente (Jolivet-Reynaud, 1998). Los puntos correspondientes a péptidos con reactividad de anticuerpo produjeron una señal azul positiva. Se estimó la intensidad de los puntos mediante visualización y se expresó como intensidad relativa en una escala comprendida entre 0 y 5.

Se obtuvo una señal positiva fuerte con los péptidos correspondientes a la región 292-305 de E1, mientras que la región 347-356 de E1 no resultó reconocida por D32.10. Los péptidos correspondientes a las regiones 482-499 y 612-626 de E2, respectivamente, también eran inmunorreactivos con D32.10 y no se detectó ninguna señal con la región 686-697 de E2. Las regiones 292-306 de E1, así como las regiones 480-494 y 608-622 de E2 en forma de pentadecapéptidos interactuaron con D32.10 en el ensayo ELISA.

Mediante la utilización de octapéptidos solapantes, la región ²⁹⁷RHWTTQGCNC³⁰⁶ (SEC ID nº 1) de la proteína E1 de VHC y las regiones ⁶¹³YRLWHYPCT⁶²¹ (SEC ID nº 3) y ⁴⁸⁰PDQRPYCWHYPPKPC⁴⁹⁴ (SEC ID nº 2) de la proteína E2 de VHC eran reactivas con D32.10. Las dos regiones identificadas en E2 contenían el mismo motivo WHYP que Yagnik *et al.* (2000) sugirieron que participaba en la heterodimerización de E1E2. En efecto, resulta difícil discriminar estas regiones. Sin embargo, la unión independiente a D32.10 de dos zonas no solapantes, ⁴⁷⁹GPDQRPYC⁴⁸⁶ (SEC ID nº 26) y ⁴⁸⁷WHYPPKPC⁴⁹⁴ (SEC ID nº 27), sugiere que D32.10 reconoce específicamente cada octapéptido y por lo tanto la secuencia completa (480-494).

Ejemplo 2. Caracterización y purificación de partículas víricas de VHC derivadas de suero

Con el fin de separar las diferentes poblaciones de VHC, el sedimento enriquecido en VHC final se sometió a centrifugación isopícnica (210.000 g durante 48 horas a 4°C) en un gradiente de densidad de sacarosa (10% a 60% p/p). Se recogieron fracciones (0,6 ml) y se determinó la densidad de cada una mediante refractometría. Se analizó el contenido de ARN de VHC mediante RT-PCR cuantitativa (Amplificador Monitor, Roche), se midió el contenido de proteínas nucleares de VHC con el ensayo Ortho-Clinical Diagnostics y se midió mediante EIA indirecta la reactividad antigénica de las partículas víricas de VHC hacia el mAb D32.10.

Se llevó a cabo un EIA indirecto tal como se ha indicado anteriormente, excepto en que los pocillos se recubrieron con las diferentes fracciones diluidas de 10^{-1} a 10^{-4} .

Se identificaron tres poblaciones diferentes (figura 4). Una población (fracciones 3 a 5) generó una banda a una densidad en sacarosa de 1,06-1,08 g/ml y carecía sustancialmente de cubierta vírica, tal como ponen de manifiesto los resultados negativos obtenidos mediante EIA indirecta con D32.10, pero contenía ARN de VHC (aproximadamente 2×10^5 UI/ml) y proteínas nucleares de VHC (entre aproximadamente 2 y 4 pg/ml). Aparentemente no existían partículas víricas sin cubierta. Otra población (fracciones 8 a 10 de la figura) generó una banda a una densidad en sacarosa de 1,14-1,15 g/ml y carecía sustancialmente de ARN de VHC (menos de aproximadamente 10^4 a 10^5 UI/ml) y de proteína nuclear de VHC (aproximadamente 1 pg/ml) pero contenía niveles elevados de partículas que respondían a D32.10 (entre aproximadamente 1 y 3,8 unidades de $DO_{450 \text{ nm}}$). Estas partículas subvíricas de VHC aparentemente contenían únicamente la cubierta vírica de VHC. La tercera población (fracciones 11 a 14) generó una banda a una densidad en sacarosa de 1,20-1,21 g/ml y contenía partículas con niveles elevados de ARN de VHC (más de aproximadamente 5×10^5 a 10^6 UI/ml) y de proteína nuclear de VHC (entre aproximadamente 2,5 y 8 pg/ml) y que respondía a D32.10 (entre aproximadamente 0,5 y 1,5 unidades de $DO_{450 \text{ nm}}$). Por lo tanto, esta población contenía sustancialmente sólo partículas víricas completas de VHC con cubierta purificadas.

Las partículas víricas contenidas en el sedimento enriquecido en VHC (figura 5A) y en la segunda (figura 5C) y tercera poblaciones (figura 5B) resultaron inmunoprecipitadas por D32.10 y se observaron mediante microscopía electrónica. Se han analizado varias preparaciones de partículas víricas de VHC mediante este procedimiento. Las

partículas subvíticas de VHC con cubierta aparentemente son partículas esféricas con un diámetro medio de aproximadamente 30 nm (33,08 nm) (figura 5C), mientras que las partículas vírica completas de VHC con cubierta presentan una apariencia igualmente esférica pero con un diámetro medio de aproximadamente 50 nm (48,72 nm) (figura 5B).

Ejemplo 2 bis. Caracterización y purificación de partículas víricas de VHC derivadas de suero

Se realizó asimismo otro análisis de la población de partículas víricas de VHC presentes en el plasma de pacientes infectados.

Purificación de partículas de VHC derivadas de suero

Se utilizó el sedimento enriquecido en VHC obtenido en el Ejemplo 1 (VHC-L) para estudios fisicoquímicos, inmunológicos y morfológicos, así como un sedimento obtenido de la plasmaféresis de otro paciente (VHC-Fan, genotipo 1a/2a), que mostraba hepatitis C crónica (CH-C) con crioglobulinemia de tipo II asociada a vasculitis cutánea severa, que requería intercambios de plasma. Respecto al VHC-I del paciente, este último paciente VHC-Fan mostraba niveles anormalmente elevados de aminotransferasas séricas (ALT/AST), era positivo para anticuerpos anti-VHC y negativo para todos los marcadores de VHB y VIH.

De esta manera se caracterizaron siete preparaciones. Eran positivas para el ARN de VHC de 10^6 UI/ml a 2.3×10^7 UI/ml (VHC-Fan, VHC-L) en el ensayo cuantitativo de seguimiento de ARN de VHC Amplicor (Roche), correspondiente a entre 2.5×10^6 y 5.7×10^7 copias/ml.

Con el fin de separar las diferentes poblaciones de VHC, el sedimento enriquecido en VHC final se sometió a centrifugación isopícnica (200.000 g durante 48 horas a 4°C) en un gradiente de densidad de sacarosa (10% a 60% o 30% a 45%, p/p). Se recogieron fracciones (0,6 ml) y se determinó la densidad de cada una mediante refractometría. Se realizó un seguimiento del contenido de ARN de VHC mediante RT-PCR cuantitativa (Amplicor Monitor, Roche). Se detectó la reactividad de la cubierta (env) del VHC utilizando el mAb D32.10 mediante EIA indirecto, tal como se ha descrito anteriormente, tras el recubrimiento de cada fracción a diferentes diluciones (1/10 a 1/10.000) sobre una fase sólida. Se sometió a ensayo el antígeno nuclear del VHC mediante la utilización de un ensayo cuantitativo Ortho y transferencia *western* utilizando una mezcla de anticuerpos monoclonales antinúcleo (7G12A8, 2G9A7 y 19D9D6) (Jolivet-Reynaud *et al.*, 1998; Menez *et al.*, 2003).

Brevemente, se llevó a cabo la medición del antígeno nuclear total de VHC en los sedimentos enriquecidos en VHC y en cada fracción recogida del gradiente de sacarosa, utilizando el ensayo Ortho^R trak-CTM (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.). El ensayo Ortho^R trak-CTM es un ensayo cuantitativo de inmunocaptura que utiliza varios anticuerpos monoclonales con especificidad para diferentes regiones del antígeno nuclear del VHC. El procedimiento utiliza una etapa de pretratamiento para proporcionar al ensayo antígenos libres, acomplejados inmunológicos y asociados a virión (Aoyagi *et al.*, 1999). Se evaluó el ARN de VHC mediante una RT-PCR cuantitativa desarrollada por Roche Molecular Systems (Meylan, Francia), AmplicorTM HCV MonitorTM. La etapa de amplificación implica un único tubo, un único enzima (ADN polimerasa rTth) y la combinación de transcripción inversa y polimerización de ADN con una única pareja de cebadores (Colucci y Gutekunst, 1997). La detección se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico en placa de micropocillos. El control de la contaminación cruzada en la PCR incluía AmpEraseTM, que ha sido incorporado en el ensayo para inactivar el ADN amplificado contaminante (Longo *et al.*, 1990).

Los sedimentos enriquecidos en VHC en primer lugar se sometieron a centrifugación isopícnica en un gradiente de densidad de sacarosa (10% a 60%). La presencia de partículas víricas con cubierta que mostraban reactividad con E1E2-D32.10 se investigó mediante el método de EIA indirecto mencionado anteriormente (figuras 14A y 14C) y transferencia *western* (figuras 14B y 14D) utilizando el MAb D32.10 anti-E1E2, cuya especificidad se había definido bien en el Ejemplo 1. Tal como se muestra en las figuras 14A y 14C, la reactividad de E1E2-D32.10 en el EAI (fracción diluida a 1/10.000) se recuperó a partir de las fracciones 9 (densidad de 1,12 g/ml) a 16 (densidad de 1,23 g/ml), con un pico de entre 1,12 y 1,17 g/ml, y un "hombro" entre 1,18 y 1,23 g/ml. Se detectó una reactividad de D32.10 (fracción diluida a 1/10) nula o muy baja en las fracciones correspondientes a los complejos de baja densidad (1,006 a 1,10 g/ml). Se obtuvieron resultados similares con el aislado VHC-L (figura 14A) de genotipo 1b y con el aislado VHC-Fan (figura 14C) de genotipo 1a/2a. Algunas fracciones (6, 8, 10, 12 y 14) del aislado VHC-L (figura 14B) y todas las fracciones (4 a 18) del aislado VHC-Fan se sometieron a SDS-PAGE y transferencia *western* con el MAb D32.10. La reactividad de E1E2-D32.10 apareció claramente entre la fracción 8 (densidad: 1,10 g/ml) y el fondo del gradiente. Debe indicarse que la reactividad de E1E2 más fuerte se observó en las fracciones 11, 12 y 13 (figura 14D), correspondientes a las densidades 1,17 a 1,20 g/ml. Pudieron detectarse unas bandas de peso molecular más alto (HMW) en estas fracciones, correspondiendo probablemente a formas oligoméricas de las glucoproteínas de cubierta E1 y E2 presentes sobre la superficie de las partículas víricas, generando bandas en dichas densidades. Se observó otra reactividad fuerte contra tanto E2 como E1 en la fracción 9 (densidad de 1,13 g/ml) correspondiente al pico del EIA (figura 14C). Todas las preparaciones de VHC derivadas de suero proporcionaron los mismos perfiles de bandeado en el equilibrio de la reactividad de E1E2-D32.10 en gradientes de densidad de sacarosa (10% a 60%).

Con el fin de caracterizar adicionalmente las poblaciones de VHC con cubierta, el sedimento de VHC-Fan se sometió a centrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 1 (2 ml de 30%, 3 ml de 35%, 3 ml de 40%, 2 ml de 45%). Bajo estas condiciones experimentales, pudieron individualizarse claramente dos picos de reactividad de E1E2-D32.10, tal como se muestra en la figura 15A. El EIA indirecto reveló un primer pico estrecho (pico 1) a una densidad de aproximadamente 1,15 g/ml y un segundo pico grande y ancho (pico 2) a una densidad de aproximadamente 1,18 a 1,22 g/ml. Las partículas de los picos 1 (fracción 8) y 2 (fracciones 12 y 13) del gradiente de sacarosa (30% a 45%) se sometieron individualmente a una segunda centrifugación de equilibrio. El pico 1 se centrifugó en un gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 2 (3 ml de 30%, 3 ml de 35%, 2 ml de 40%, 2 ml de 45%) (figura 15B). Únicamente un pico antigénico E1E2 estrecho (pico 1) se desplazó hasta una densidad de 1,13 a 1,14 g/ml (aproximadamente sacarosa al 32%, fracciones 5 y 6). El pico 2 se centrifugó en un gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 3 (2 ml de 30%, 2 ml de 35%, 3 ml de 40% y 3 ml de 45%) (figura 15C). Un pico principal (pico 2) sedimentó mucho más rápido, mostrando antigenicidad de E1E2 máxima a una densidad de aproximadamente 1,18 g/ml (correspondiente a sacarosa al 40%). El último pico antigénico E1E2 (pico 2) presentaba una apariencia asimétrica, con las densidades más bajas desplazadas hacia adelante, y con ligero solapamiento con el bandeo de la población E1E2 a una densidad en sacarosa de 1,14 g/ml (pico 1), sugiriendo una mayor heterogeneidad que el pico antigénico E1E2 anterior (pico 1) (figuras 15B, 15C).

Con el fin de elucidar las diferentes de densidad de flotación entre las dos poblaciones de partículas víricas con cubierta E1E2 (picos 1 y 2), las fracciones de gradiente de sacarosa de 30% a 45% de tipo 1 indicadas anteriormente se sometieron a ensayo para el antígeno nuclear de VHC mediante el ensayo de núcleo de VHC Ortho (figura 9A) y mediante transferencia *western* (figura 15B).

Brevemente, se determinó la especificidad de polipéptido mediante inmunotransferencia utilizando muestras de VHC a modo de sondas antigénicas (1 a 5 µg/ml). Se llevó a cabo una electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida (PAGE) en geles al 12,5% bajo condiciones reductoras (SDS al 2% + 2-ME al 5%). Tras la transferencia de proteínas a membranas de PVDF, se utilizó el mAb D32.10 anti-E1E2 (2 a 5 µg/ml) o los MAb antinúcleo 7G12A8, 2G9A7 y 19D9D6 (5 µg/ml cada uno) como anticuerpos primarios, diluidos en NHS al 50% y las IgG unidas se detectaron mediante incubación con fragmento (Fab')₂ conjugado con HRPO antiinmunoglobulinas de ratón (diluido 1/10.000, obtenido de Immunotech), como segundo anticuerpo. Los filtros se revelaron con un sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL Plus) de Amersham.

Ambos enfoques experimentales demostraron que se recuperaba la reactividad máxima de antígeno nuclear de VHC en el segundo pico antigénico E1E2 (pico 2) a una densidad de aproximadamente 1,17 a 1,19 g/ml (sacarosa al 40%). Mediante análisis de transferencia *western* (figura 9B), se identificó la proteína nuclear del VHC de 25 kDa en el material inicial (sedimento VHC-Fan) y en las fracciones 8 a 13. También se detectaron bandas en 50, 75 y 150 kDa, que podrían corresponder a oligómeros del producto codificado por el gen nuclear de VHC. Se analizó el ARN de VHC mediante el ensayo cuantitativo RT-PCR Monitor (Roche) de todas las fracciones del gradiente inicial de sacarosa de 10% a 60% (figura 10). Se observaron dos picos de ARN vírico a una densidad de 1,055 a 1,075 g/ml y a una densidad de 1,16 a 1,21 g/ml. El título total de este último pico era de 10⁶ IU/ml y correspondía al segundo pico antigénico de E1E2 (pico 2). En contraste, la fracción 9 (densidad de 1,13 g/ml), que correspondía al pico 1, contenía el título más bajo de ARN de VHC. De esta manera, el pico 2 (aproximadamente 1,17 a 1,20 g/ml) contenía complejos E1E2, proteína nuclear de VHC y un título elevado de ARN de VHC y probablemente representa viriones completos. El pico 1 (1,13 a 1,15 g/ml) contenía principalmente complejos E1E2 y probablemente representa partículas subvíricas (SVP). Los complejos de baja densidad (1,006 a 1,10 g/ml) contenía únicamente núcleo y ARN de VHC, correspondiendo a nucleocápsides desnudas.

De esta manera, utilizando el anticuerpo monoclonal D32.10 de la invención, se analizaron los tipos más prevalentes de partículas víricas con cubierta presentes en el suero de pacientes de hepatitis C crónica. Mediante sedimentación en gradientes de sacarosa del material vírico concentrado, análisis de la composición de proteínas (proteínas de núcleo y de cubierta) mediante inmunoensayos e inmunotransferencia, acoplado al seguimiento del ARN de VHC mediante RT-PCR cuantitativa, se identificaron dos poblaciones de partículas con cubierta de E1E2 que sedimentaban en dos densidades diferentes, 1,13-1,15 g/ml y 1,17-1,21 g/ml, respectivamente. La primera población correspondía a partículas subvíricas (SVP) que contenían las proteínas de cubierta E1 y E2, pero no presentaba nucleocápsides. La segunda población podría corresponder a viriones de VHC, debido a que estas partículas contenían las proteínas de cubierta E1 y E2, las proteínas nucleares y un título elevado de ARN de VHC.

Caracterización morfológica de partículas de VHC derivadas de suero

Se llevó a cabo la microscopía electrónica del sedimento de VHC-Fan tras la inmunoprecipitación con anticuerpo monoclonal específico de E1E2(D32.10) (inmunomicroscopía electrónica, o IEM) siguiendo el procedimiento siguiente.

Brevemente, se mezclaron preparaciones de VHC derivadas de suero (2, 20 ó 200 µg) o fracciones de gradientes (0,1 ml) con 0,1 ml de MAb D32.10 (5 µg) o anticuerpo monoclonal irrelevante (F35.25, anti-preS1 de VHB) (Petit *et al.*, 1989) del mismo isotipo (IgG1). La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora, después a 4°C durante 16

horas. A continuación, la mezcla se diluyó en 10 ml de tampón TNE y se centrifugó a 48.000 g durante 1 hora. El sedimento se resuspendió en 0,1 ml de tampón TNE. Las partículas de VHC inmunoprecipitadas con D32.10 se adsorbieron durante 5 minutos sobre rejillas Cupron de Formvar/recubiertas de carbono sometidas a descarga luminiscente y teñidas durante 4 minutos con acetato de uranilo al 1% (pH 4,5). A continuación, las preparaciones se

visualizaron utilizando un microscopio electrónico JEOL 100 CX (servicio de imágenes, Laennec Faculty, Lyon, Francia). Para el marcaje indirecto con inmunoro, las rejillas se incubaron con una dilución 1:50 de partículas de oro coloidal-IgG de cabra antirratón (diámetro de 10 nm, BioCell Research Laboratories) como segundo anticuerpo.

Los experimentos de control demostraron que la heterogeneidad de tamaños de las preparaciones variaba según la proporción de antígeno:anticuerpo (resultados no mostrados). Con el fin de conservar la integridad morfológica, el procedimiento de aislamiento de las partículas de VHC implicaba únicamente precipitación y centrifugación en gradiente de sacarosa. Bajo estas condiciones experimentales, se obtuvo una distribución de tamaños de partícula relativamente bien definido, tal como se muestra en la figura 11A. El pico asimétrico se encontraba centrado en aproximadamente 35 nm. Las partículas de este tamaño (30 a 40 nm) eran predominantes (56%). Esencialmente la mayoría de las partículas (80%) presentaba un diámetro superior a 30 nm, con un valor medio de 38,28 nm (125 de entre 156 partículas), el 20% de ellas era de entre 40 y 50 nm (valor medio=43,61 nm) y el 4% de entre 50 y 60 nm (valor medio=55,69 nm). Sólo el 20% del total de partículas presentaba un diámetro inferior a 30 nm (valor medio=26,35 nm). Las micrografías electrónicas (figura 11B) muestran que las partículas de VHC se caracterizan por una superficie suave relativamente uniforme. La figura 11B, paneles a y b, ilustra la heterogeneidad de tamaño de las partículas de VHC con cubierta. La figura 11B, panel c, muestra partículas con un diámetro de 50 nm, y el panel d, aquellas con un diámetro de 35 nm. Apareció una densidad más alta bastante homogénea sobre la superficie, de partículas de 35 nm (figura 11B, panel d), mientras que podía observarse claramente un área más ligera de menor densidad en el centro, de partículas con un diámetro de 50 nm (figura 11B, panel c). No se visualizaron partículas mediante IEM al utilizar un anticuerpo monoclonal primario irrelevante (figura 11B, panel e). Se inmunoprecipitaron partículas de los picos 1 y 2 del gradiente de sacarosa, se tiñeron y también se analizaron mediante inmunoelectromicroscopía (IEM) (figuras 12A-12B). Tal como se muestra en la figura 12A, la especie predominante (85,4%) en el pico 1 era una partícula esférica con un diámetro de aproximadamente 20 nm (35 de 41 partículas, valor medio=20,6 nm). Sólo 14,6% de las partículas presentaba un diámetro superior a 30 nm, probablemente correspondiente a un solapamiento con el pico 2. El pico 2 aparentemente era algo más heterogéneo en cuanto a tamaños que el material del pico 1 (figura 12B). Sin embargo, las formas más prevalentes (77,5%) en esta población presentaban un diámetro medio de aproximadamente 41 nm (69 de 89 partículas, valor medio=41,15 nm), que podrían corresponder al diámetro del virión de VHC completo. En esta preparación resultaban visibles algunas de las partículas más pequeñas, de 30 nm de diámetro (13,5%), que probablemente resultan del solapamiento con el pico 1. El pico heterogéneo mayor, de sedimentación más rápida (pico 2), estaba constituido principalmente por partículas grandes de 35 y 50 nm de diámetro, mientras que el pico homogéneo menor, de sedimentación más lenta (pico 1), estaba constituido por partículas pequeñas, de aproximadamente 20 nm de diámetro. Conjuntamente, los estudios morfológicos indican que coexisten dos clases de tamaño de partículas de VHC con cubierta de E1E2 en el suero de los pacientes infectados. Mediante marcaje indirecto con inmunoro (figura 13), todas las partículas esféricas con cubierta, identificadas previamente mediante IEM, fijaron específicamente anticuerpo secundario marcado con partículas de oro de 10 nm.

De esta manera, la inmunoelectromicroscopía con mAb D32.10, se determinó una distribución de tamaños de partícula relativamente bien definida de la población con cubierta total (sedimento enriquecido en VHC) y de cada población de E1E2, separadamente. Las partículas de VHC con cubierta presentaban un tamaño heterogéneo, pero pudieron identificarse fácilmente dos clases de tamaño de las partículas. Una especie predominante consistía de partículas grandes, con un diámetro que variaba entre 35 nm y 50 nm, dependiendo probablemente de la estructura de red de la cubierta, correspondientes a partículas completas con cubierta que contenían cápside. Otra especie más homogénea consistía de partículas pequeñas, con un diámetro de aproximadamente 20 nm, correspondientes a SVP sin cápside. Todas estas partículas que se unían a mAb D32.10 se identificaron y visualizaron adicionalmente mediante microscopía electrónica utilizando un marcaje indirecto con partículas de oro-IgG antirratón.

La formación de SVP no infecciosas, además de viriones infecciosos, es una característica común de las infecciones por flavivirus (Russel *et al.*, 1980). Se ha sugerido que las primeras representan cubiertas víricas vacías sin cápside (Mason *et al.*, 1991). También se observan en células infectadas por virus de la hepatitis B (VHB) y se producen SVP que se secretan, mediante expresión de solo proteínas de cubierta (Laub *et al.*, 1983). Estas partículas son de menor tamaño que los viriones. Esto demuestra que estas proteínas son capaces intrínsecamente de autoformar estructuras particuladas específicas en presencia o en ausencia de un núcleo. Estas partículas se ensamblan y experimentan el mismo proceso de maduración que los viriones completos, incluyendo la glucosilación y procesamiento con carbohidratos. La inmunización con dichas SVP con cubierta recombinantes muestra que son excelentes inmunógenos protectores en modelos animales (Konishi *et al.*, 1992; Heinz *et al.*, 1995), así como en seres humanos (Leroux-Roels *et al.*, 1994).

La reactividad de los viriones completos y de las SVP con mAb D32.10 demuestra que el epítipo conformacional E1(297-306)-E2(480-494) (613-621) se presenta esencialmente de la misma manera sobre la superficie de los viriones de VHC y sobre las SVP. Sin embargo, dicho epítipo detectado sobre viriones y SVP derivados de suero no se encuentra sobre partículas obtenidas mediante recombinación genética y se produce en sistemas heterólogos de

baculovirus/células de insecto (Baumert *et al.*, 1999) o de retrovirus/células 293T (Bartosch *et al.*, 2003), sugiriendo que este sitio compuesto se encuentra ausente y/o presente en regiones inaccesibles separadas sobre las superficies de dichas partículas de VHC recombinantes. Las primeras partículas de tipo VHC (VHC-LP) se retuvieron en el RE, y sólo una fracción reducida de dichas pseudopartículas de VHC (VHCpp) alcanzó la superficie celular. Debe indicarse que mAb D32.10 no es reactivo con HSA o con las cadenas γ o μ de inmunoglobulinas. Puede inmunoprecipitar específicamente E1 y E2, así como los heterodímeros E1E2, en el caso de que estas dos proteínas sean expresadas separadamente o conjuntamente por virus Vaccinia recombinantes en células HepG2. De esta manera, reacciona principalmente con agregados unidos mediante enlaces disulfuro y más débilmente con complejo E1E2 maduro no unido covalentemente. Sin embargo, no reconoce la proteína E1 o E2 recombinante y desnaturalizada expresada en dicho sistema heterólogo, según el análisis de transferencia. Esto concuerda con una organización de E1, E2 y E1E2 sobre la superficie del virus derivado de suero que es diferente de la presente en las partículas de VHC recombinantes. La estructura natural depende de las condiciones de ensamblaje. En el caso de que las condiciones que regulan la formación de una estructura única no se encuentren presentes en sistemas heterólogos, la organización del dímero en las VLP y VHCpp no es similar, en contraste con la similitud entre las superficies de las SVP y de los viriones en el caso de que se aíslan ambas del suero de pacientes infectados. Una característica particularmente notable del empaquetamiento de las proteínas de cubierta (E) de los flavivirus, entre ellos el virus de la encefalitis transmitida por garrapata (TBEV), en partículas subvíticas recombinantes (RSP) y en viriones, es que se disponen planas sobre la superficie vírica, en una orientación de cabeza-a-cola (Ferlengi *et al.*, 2001). La superficie lateral del dominio III, que presenta un pliegue de tipo Ig y participa en la unión a receptores, es accesible, mientras que el péptido de fusión es un bucle interno (Rey *et al.*, 1995). Por lo tanto, los flavivirus entran en las células mediante endocitosis mediada por receptores y fusión inducida por pH bajo en endosomas (Rice, 1996). Se cree que una partícula en ensamblaje obtiene su cubierta mediante gemación a través de la membrana del RE o de un compartimiento intermedio de la ruta secretoria temprana. A continuación, las partículas son transportadas a través de la red trans-Golgi (TGN) hasta la membrana plasmática, maduran y de esta manera adquieren sacáridos complejos. Todas estas etapas resultan cruciales para el ensamblaje del virus y desempeñan un papel crucial en muchas etapas del ciclo de replicación.

Inesperadamente, todas las partículas de VHC muestran aparentemente unas propiedades biofísicas similares con independencia de su origen. El patrón de sedimentación en gradiente de sacarosa de las VHC-LP ensambladas en células de insecto, derivadas a partir de ADNc de VHC cepa J o del clon infeccioso H77c, era de entre 1,14 y 1,20 g/ml en gradientes de sacarosa en el equilibrio (Wellnitz *et al.*, 2002). La mayoría de las partículas presentaba un diámetro de entre 40 y 60 nm. Sin embargo, todos los epítomos presentados sobre los ectodominios de E1 y E2 de la superficie externa de las VHC-LP (Wellnitz *et al.*, 2002) eran diferentes de la especificidad para E1 y E2 ofrecida por el MAb D32.10. Por lo tanto, aunque las partículas sedimenten a la misma densidad en sacarosa, presentan diferentes inmunorreactividades, lo que puede relacionarse con un transporte y/o plegamiento incorrectos, y evidentemente resulta en diferentes propiedades funcionales, en términos de unión e infectividad celulares.

Al contrario que las partículas de VHC con cubierta del suero, las partículas de núcleo de VHC aisladas a partir del plasma de individuos infectados por VHC aparentemente son similares a las partículas de tipo nucleocápside producidas en las células de insecto. Las nucleocápsides de VHC generaban una banda a una densidad de entre 1,32 y 1,34 g/ml en el gradiente de CsCl y presentaban un tamaño muy heterogéneo, de entre 38 y 62 nm de diámetro (Maillard *et al.*, 2001). Todas estas partículas eran reactivas con mAb antinúcleo, pero no con mAb anti-E1 y anti-E2 producidos mediante inmunización con proteínas recombinantes (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994).

De esta manera, diferentes tipos de partículas de tipo VHC (VHC-LP, nucleocápsides de VHC de suero, viriones de VHC de suero) presentan algunas similitudes de tamaño y/o densidad, pero muestran diferentes propiedades antigénicas (plegamiento incorrecto o correcto de los complejos E1E2, viriones con cubierta o nucleocápsides sin cubierta). Por lo tanto, conjuntamente lo anterior demuestra que resulta crucial disponer de buenas herramientas inmunológicas para analizar las propiedades antigénicas reales de las partículas de VHC, para identificar así los viriones de VHC naturales.

A partir de dichos datos y de los de otros (Andre *et al.*, 2002; Maillard *et al.*, 2001), podría obtenerse una mejor información sobre el espectro completo de las diferentes formas de partículas de tipo VHC circulantes en el suero de los pacientes de hepatitis C crónica. Las fracciones de baja densidad en gradiente de sacarosa (1,06 g/ml) contenían estructuras de tipo cápside, asociadas a lipoproteínas formando partículas lipovíricas (LVP) y con ARN de VHC e inmunoglobulinas, dependiendo de las variaciones individuales (Andre *et al.*, 2002). Las LVP presentaban una apariencia de partículas grandes, de más de 100 nm de diámetro, y se unían a la línea celular de hepatocitos a través de receptores de LDL (Andre *et al.*, 2002). Las nucleocápsides de VHC sin cubierta aisladas a partir de sueros tratados con detergente presentaban una densidad de flotación de entre 1,32 y 1,34 g/ml en CsCl, presentaban un tamaño heterogéneo (Maillard *et al.*, 2001) y recientemente se ha demostrado que muestran actividad similar a FyR (Maillard *et al.*, 2004), lo que podría explicar la asociación entre las partículas que contienen ARN de VHC y anticuerpos "no inmunológicos" formando complejos de núcleo de VHC-IgG de alta densidad (1,28 a 1,35 g/ml) en el gradiente de sacarosa. Las fracciones de densidad intermedia, de entre 1,13 y 1,21 g/ml, se identificaron como partículas de VHC con cubierta E1E2. La densidad media del virión VHC completo putativo (1,18 a 1,20 g/ml), constituido por nucleocápside, membrana lipídica y dos glucoproteínas de cubierta E1 y E2, era similar

a la de los flavivirus (Bradley *et al.*, 1991). La hipótesis de interacciones laterales de las proteínas de cubierta, deducidas a partir de la especificidad fina del MAb D32.10, también concuerda con la organización de la cubierta de SVP recombinantes procedentes de TBEV y de partículas víricas completas (Schalich *et al.*, 1996). Finalmente, la presencia en el suero de pacientes infectados por VHC de SVP que contienen únicamente las proteínas de cubierta E1E2, las cuales muestran propiedades de sedimentación diferentes (1,13 a 1,15 g/ml) y diferentes tamaños de partícula (≈ 20 nm) pero características antigénicas similares a las de las partículas víricas completas, apoya algunas similitudes entre el VHC y los flavivirus.

En conclusión, mediante la utilización de un nuevo MAb D32.10, se identificaron por primera vez:

- (i) viriones completos de VHC, que contenían tanto ARN de VHC como antígeno nuclear, y que expresaban complejos de cubierta E1E2 sobre su superficie, como "partículas grandes", con un diámetro de entre 35 y 50 nm, y que generaban una banda en 1,17-1,21 g/ml,
- (ii) una población de VHC de SVP de cubierta, como "partículas pequeñas", sin cápside ni ARN de VHC, con un diámetro de entre 20 y 30 nm, y que generaban una banda en 1,13-1,15 g/ml.

Por lo tanto, dichas partículas con cubierta podrían representar un modelo relevante para investigar la relación estructura-función de las glucoproteínas de cubierta de VHC, y un candidato excelente para enfoques de vacunación. Además, resultará interesante realizar un seguimiento del espectro de partículas de VHC circulantes en diferentes grupos de pacientes y en diferentes estadios de la enfermedad asociada al VHC.

Ejemplo 3. Obtención de un anticuerpo monoclonal dirigido contra las partículas víricas purificadas completas de VHC con cubierta

La fracción del sedimento enriquecido en VHC anteriormente indicado sometido a centrifugación isopícnica en un gradiente de densidad de sacarosa, que contenía las partículas víricas purificadas completas de VHC con cubierta, se utilizó para preparar un anticuerpo monoclonal. Esta fracción se utilizó para inmunizar ratones y aislar hibridomas tal como se ha explicado anteriormente. De esta manera, se obtuvo un anticuerpo monoclonal, (D4.12.9), que se demostró que reconocía específicamente la proteína E2 de VHC natural en experimentos de transferencia *western* (figura 6) y las partículas víricas de VHC naturales mostradas en el Ejemplo 2 (figura 7). En efecto, la figura 7 muestra que D4.12.9 reconoce tanto las partículas subvíricas con cubierta de VHC (fracciones 8 a 11) como las partículas víricas completas de VHC con cubierta (fracciones 11 a 14), de una manera similar a D32.10.

Ejemplo 4. Caracterización epitópica de los anticuerpos anti-VHC derivados de pacientes infectados

Se evaluó la inmunorreactividad de las secuencias peptídicas derivadas de E1 y E2 reactivas con D32.10 (Ejemplo 1) para los sueros de pacientes infectados por VHC, mediante la utilización de péptidos que comprendían dichas secuencias.

Se produjeron las secuencias de E1 (aminoácidos 290 a 317) y de E2 (aminoácidos 471 a 500 y 605 a 629) en forma de péptidos sintéticos biotinilados para el ensayo mediante ELISA con 11 sueros procedentes de individuos sanos y 44 sueros de pacientes infectados por VHC (numerados A1 a A44).

Los pocillos de placas de microtitulación se recubrieron durante la noche a 4°C con 100 μ l de estreptavidina a una concentración de 10 μ g/ml en tampón carbonato 0,1 M (pH 9,6) y se bloquearon durante 1 hora a 37°C con PBS que contenía suero de cabra al 10%. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% antes de la adición de 100 μ l de una solución de péptidos biotinilados (10 μ g/ml en PBS) durante 2 horas a 37°C. Tras un nuevo lavado con PBS-Tween, se añadieron 100 μ l del suero analizado, diluido 1:50 en PBS-Tween que contenía suero de cabra al 10%, y se incubó durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente con PBS-Tween. El anticuerpo secundario, anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) se añadió a continuación a una dilución 1:5.000 en PBS-Tween-suero de cabra. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y después se lavaron una vez más con PBS-Tween. Se revelaron las placas utilizando el kit de color Biomerieux que contiene o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno. Tras 10 minutos de incubación, las placas se leyeron a 492 nm con un lector de placas ELISA. Los valores de los que se informa son la DO media de muestras por triplicado.

Se calculó un valor de corte de identificación para cada péptido (media de los valores obtenidos con sueros negativos para VHC + 3 desviaciones estándares). Permite poner de manifiesto las respuestas positivas con 6 de 44 sueros positivos para VHC contra E1 (aminoácidos 290 a 317) (figura 8A), 6 de 44 contra E2 (aminoácidos 471 a 500) (figura 8B) y 16 de 44 contra E2 (aminoácidos 605 a 629) (figura 8C). Los sueros A7, A14, A21, A33, A39 y A49 proporcionaron una señal positiva con los tres péptidos, mientras que E2 (605 a 629) también resultó reconocido por 10 sueros más.

La presencia en los sueros de pacientes infectados por VHC de anticuerpos específicos que pueden reaccionar simultáneamente con las tres regiones de E1 y E2 reconocidas por mAb D32.10 apoya fuertemente la yuxtaposición

en la superficie de las partículas víricas de VHC con cubierta circulantes y su inmunogenicidad en ratones, así como en seres humanos.

Referencias

- 5 Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala, y V. Lotteau. 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76:6919-28
- 10 Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S. *J. Clin. Microbiol.* (1999) 37:1802-1808
- Bartenschlager R, Lohman V. J. *Gen. Virol.* (2000) 81:1631-1648
- 15 Bartosch, B., J. Dubuisson, y F. L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633-42.
- Baumert, T. F., J. Vergalla, J. Satoi, M. Thomson, M. Lechmann, D. Herion, H. B. Greenberg, S. Ito, y T. J. Liang. 1999. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 117:1397-407.
- 20 Bradley, D., K. McCaustland, K. Krawczynski, J. Spelbring, C. Humphrey, y E. H. Cook. 1991. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* 34:206-8.
- Buttin B, Leguem C, Phalente L, Lin ECC, Medrano L, Cazenave PA. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* (1978) 81:27-36
- 25 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. *Science* (1989) 244:359-362
- Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:2451-2455
- 30 Clarke B. J. *Gen. Virol.* (1997) 78:2397-410
- Colucci, G., y K. Gutekunst. 1997. Development of a quantitative PCR assay for monitoring HCV viraemia levels in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 4 Suppl 1:75-8.
- 35 Damen M, Sillekens P, Cuypers HT, Frantzen I, Melsert R. *J. Virol. Methods* (1999) 82:45-54
- Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J. *Journal of Virology* (1997) 71:697-704
- 40 Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, y C. M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 68:6147-60.
- 45 Dubuisson J, Rice C. *Journal of Virology* (1996) 70:778-786
- Dubuisson J. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (2000) 242:135-148
- 50 Ferlenghi, I., M. Clarke, T. Ruttan, S. L. Allison, J. Schlich, F. X. Heinz, S. C. Garrison, F. A. Rey, y S. D. Fuller. 2001. Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Mol Cell* 7:593-602.
- Frank R, Döring R. *Tetrahedron* (1988) 44:6031-6040
- 55 Heinz, F. X., S. L. Allison, K. Stiasny, J. Schlich, H. Holzmann, C. W. Mandl, y C. Kunz. 1995. Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 13: 1636-42.
- Hijkata, M., Y. K. Shimizu, H. Kato, A. Iwamoto, J. W. Shih, H. J. Alter, R. H. Purcell, y H. Yoshikura. 1993. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 67:1953-8.
- 60 Jolivet-Reynaud C, Dalbon P, Viola F, Yvon S, Paranhos-Baccala G, Piga N, Bridon L, Traub MA, Battail N, Sibai G, Jolivet M. *J Med Virol* (1998) 56:300-309
- 65 Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, H. Hagiwara, E. Mita, M. Naito, A. Kasahara, H. Fusamoto, y T. Kamada. 1995. Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts: implications for virus neutralization or persistence. *J Hepatol* 22:440-8

Kohler G, Milstein C. *Nature* (1975) 256:495-497

Konishi, E., S. Pincus, E. Paoletti, R. E. Shope, T. Burrage, y P. W. Mason. 1992. Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology* 188:714-20.

Laub, O., L. B. Rall, M. Truett, Y. Shaul, D. N. Standring, P. Valenzuela, y W. J. Rutter. 1983. Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. *J Virol* 48:271-80.

Leroux-Roels, G., E. Van Hecke, W. Michielsen, P. Voet, P. Hauser, y J. Petre. 1994. Correlation between in vivo humoral and in vitro cellular immune responses following immunization with hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccines. *Vaccine* 12:812-8.

Longo, M. C., M. S. Berninger, y J. L. Hartley. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-8.

Lowry O, Rosebrough A, Farr A, Randall R. J. *Biol. Chem.* (1951) 193:265-275

Maillard, P., K. Krawczynski, J. Nitkiewicz, C. Bronnert, M. Sidotkiewicz, P. Gounon, J. Dubuisson, G. Faure, R. Crainic, y A. Budkowska. 2001. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 75:8240-50.

Maillard, P., J. P. Lavergne, S. Siberil, G. Faure, F. Roohvand, S. Petres, J. L. Teillaud, y A. Budkowska. 2004. Fc {gamma} Receptor-like Activity of Hepatitis C Virus Core Protein. *J Biol Chem* 279:2430-2437.

Mason, P. W., S. Pincus, M. J. Fournier, T. L. Mason, R. E. Shope, y E. Paoletti. 1991. Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 180:294-305.

Menez, R., M. Bossus, B. H. Muller, G. Sibai, P. Dalbon, F. Ducancel, C. Jolivet-Reynaud, y E. A. Stura. 2003. Crystal structure of a hydrophobic immunodominant antigenic site on hepatitis C virus core protein complexed to monoclonal antibody 19D9D6. *J Immunol* 170:1917-24.

Op De Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J. J. *Gen. Virol.* (2001) 82:2589-95

Pearson WR, y Lipman DJ. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85:2444-2448

Petit MA, Capel F, Riottot MM, Dauguet C, Pillot J. J. *Gen. Virol.* (1987) 68:2759-2767

Petit, M. A., S. Dubanchet, y F. Capel. 1989. A monoclonal antibody specific for the hepatocyte receptor binding site on hepatitis B virus. *Mol Immunol* 26:531-7.

Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, y S. C. Harrison. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375:291-8.

Rice, C. 1996. Flaviviridae: the viruses and their replication, p. 931-959. En K. D. Fields BN, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, y Straus SE (ed.), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.

Russell, P., Brandt WE y Dalrymple JM. 1980. Chemical and antigenic structure of flaviviruses, p. 503-529. En S. RW (ed.), *The Togaviruses. Biology, Structure, Replication*. Academic Press, New York.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1977) 74:5463-5467

Sato K, Okamoto H, Aihara S, Hoshi Y, Tanaka T, Mishiro S. *Virology* (1993) 196:354-357

Schalich, J., S. L. Allison, K. Stiasny, C. W. Mandl, C. Kunz, y F. X. Heinz. 1996. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J Virol* 70:4549-57

Scott JK, Smith GP. *Science* (1990) 249:386-390

Thomssen, R., S. Bonk, C. Propfe, K. H. Heermann, H. G. Kochel, y A. Uy. 1992. Association of hepatitis C virus in

human sera with beta-lipoprotein. Med Microbiol Immunol (Berl) 181:293-300.

Wellnitz, S., B. Klumpp, H. Barth, S. Ito, E. Depla, J. Dubuisson, H. E. Blum, y T. F. Baumert. 2002. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. J Virol 76:1181-93.

Yagnik AT, Lahm A, Meola A, Roccasecca R M, Ercole BB, Nicosia A, Tramontano A. Proteins (2000) 40:355-366

Yoshikura, H., M. Hijikata, N. Nakajima, y Y. K. Shimizu. 1996. Replication of hepatitis C virus. J Viral Hepat 3:3-10.

Young KK, Resnick RM, Myers TW. J. Clin. Microbiol. (1993) 31:882-886

Listado de secuencias

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE BIOMERIEUX

<120> NUEVOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C, COMPOSICIONES DE PARTICULAS DESTINADAS A SER RECONOCIDAS POR DICHOS ANTICUERPOS, Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE CONTIENEN LOS MISMOS

<130> WOB 03 AG INS VHC1

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 1

Arg	His	Trp	Thr	Thr	Gln	Gly	Cys	Asn	Cys
1				5					10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 2

Pro	Asp	Gln	Arg	Pro	Tyr	Cys	Trp	His	Tyr	Pro	Pro	Lys	Pro	Cys
1				5					10					15

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 3

Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro	Cys	Thr
1					5			

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 4

ccctcatagt tagcgtaacg

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Virus de la hepatitis C

 <400> 5

 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Thr Gln Gly
 1 5 10 15

 Cys Asn Cys Ser
 20
 10
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptidos expresados en fagos

 <400> 6
 20
 Ser Pro Leu Arg His Tyr Glu Leu Pro Leu Ile Gln
 1 5 10

 <210> 7
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptidos expresados en fagos
 30
 <400> 7

 Trp Pro His Asn His Ser Thr His Ser Arg Thr His
 1 5 10
 35
 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Péptidos expresados en fagos

 <400> 8

 Phe Pro Lys Tyr His Pro Arg Phe His Lys His Ala
 1 5 10
 45
 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptidos expresados en fagos
 55
 <400> 9

Ser Gln Arg Ser Arg His Trp His Asp Val Pro Lys
1 5 10

<210> 10
<211> 12
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptidos expresados en fagos
10 <400> 10

Thr Ser Gln Pro Arg Trp His Gln Lys Pro Ala Thr
1 5 10

15 <210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

20 <400> 11

Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly
1 5 10 15

Ile Ala Tyr Phe Ser
20

25 <210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Péptidos expresados en fagos
<400> 12

Trp Lys Met Pro Arg Ala Thr Asp Trp Asn Leu Arg
1 5 10

35 <210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptidos expresados en fagos
<400> 13

45 His Trp Gly Asn His Ser Lys Ser His Pro Gln Arg
1 5 10

<210> 14
<211> 12
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptidos expresados en fagos
55 <400> 14

Trp His Arg Thr Pro Ser Thr Leu Trp Gly Val Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 21
5 <212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 15

Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys Gly Ile
1 5 10 15

Val Pro Ala Lys Ser
10 20

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptidos expresados en fagos

20 <400> 16

Trp His Lys Leu Pro Gly His Pro Arg Thr Val
1 5 10

<210> 17
25 <211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Péptidos expresados en fagos

<400> 17

Thr Phe Ala Trp His Lys Pro Arg Val Asn Leu Gly
1 5 10

35 <210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptidos expresados en fagos

<400> 18

45 His Ser Ser Trp Tyr Ile Gln His Phe Pro Pro Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 12
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptidos expresados en fagos

55 <400> 19

Phe Pro Ala His Pro Leu Pro Arg Leu Pro Ser Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 22
5 <212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 20

Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr Thr
1 5 10 15

Ile Phe Lys Ile Arg Met
10 20

<210> 21
<211> 13
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptidos expresados en fagos

20 <400> 21

Trp His Trp Asn Lys Pro Ile Ile Arg Pro Pro Leu Arg
1 5 10

<210> 22
25 <211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Péptidos expresados en fagos

<400> 22

Gln Pro Tyr Lys Leu Gln Ala Ala Ala Thr Leu Tyr
1 5 10

35 <210> 23
<211> 14
<212> PRT
40 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 23

Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp
1 5 10

45 <210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Péptidos expresados en fagos

<400> 24

His Leu Tyr His Lys Asn Arg Asn His His Ile Ala Tyr
55 1 5 10

<210> 25
 <211> 12
 <212> > PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptidos expresados en fagos
 <400> 25
 10
 Trp Ser Pro Gly Gln Gln Arg Leu His Asn Ser Thr
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 26
 Gly Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys
 20 1 5
 <210> 27
 <211> 8
 <212> > PRT
 25 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 27
 Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys
 30 1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo conformacional que puede unirse específicamente al epítipo conformacional constituido por las tres secuencias siguientes:
5
 - los aminoácidos 297 a 306 de la proteína E1 del VHC (SEC ID nº 1);
 - los aminoácidos 480 a 494 de la proteína E2 del VHC (SEC ID nº 2); y
 - los aminoácidos 613 a 621 de la proteína E2 del VHC (SEC ID nº 3),
- 10 y que puede unirse específicamente a la proteína E1 del VHC natural y a la proteína E2 del VHC natural, y de hacer precipitar el complejo E1E2 del VHC bajo sus formas covalentes o no covalentes.
2. Anticuerpo conformacional según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 15 3. Anticuerpo conformacional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
4. Anticuerpo conformacional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 20 5. Anticuerpo conformacional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de entre el grupo de Fab, F(ab')₂ y scFv.
- 25 6. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2, secretado por el hibridoma depositado en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Francia) el 19 de marzo de 2003, bajo el número de acceso CNCM I-2983.
7. Hibridoma depositado en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Francia) el 19 de marzo de 2003, bajo el número de acceso CNCM I-2983.
- 30 8. Composición farmacéutica que comprende como sustancia activa por lo menos uno de los anticuerpos según las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento administrado a un paciente infectado o no con VHC, con el fin de neutralizar la infección por VHC.
- 35 10. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento destinado al diagnóstico, a la prevención o al tratamiento de las infecciones por VHC.
- 40 11. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la utilización en la neutralización de una infección por VHC en un paciente infectado o no con VHC.
12. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la utilización en el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de infecciones por VHC.

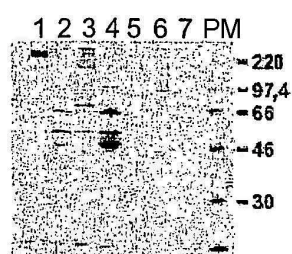


Figura 1A

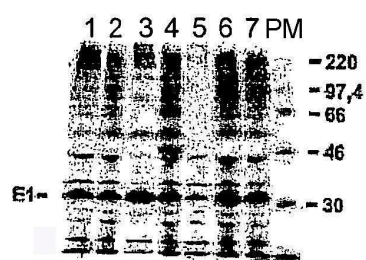


Figura 1B



Figura 1C

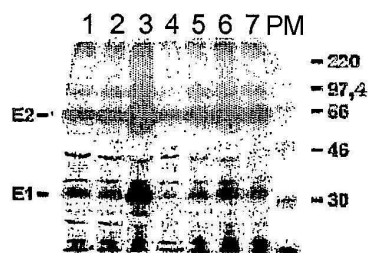


Figura 1D

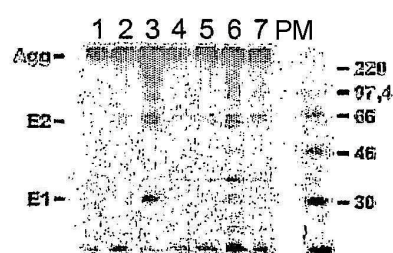


Figura 1E

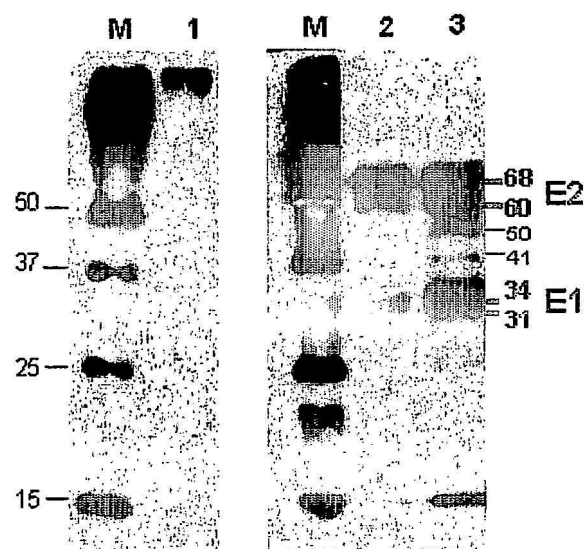


Figura 2

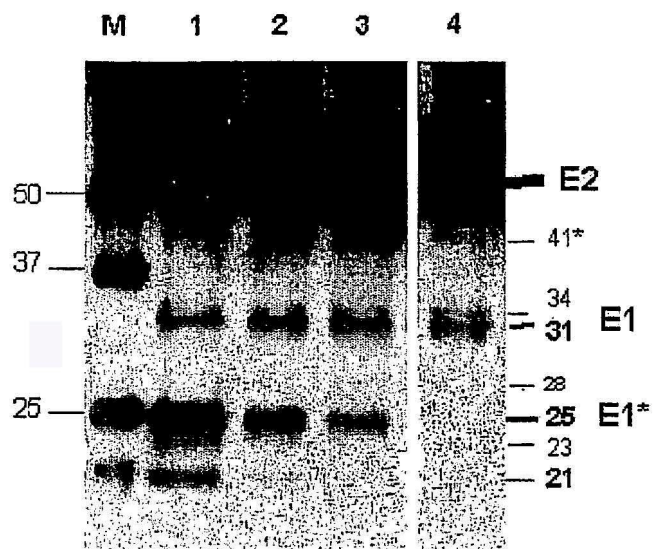


Figura 3A

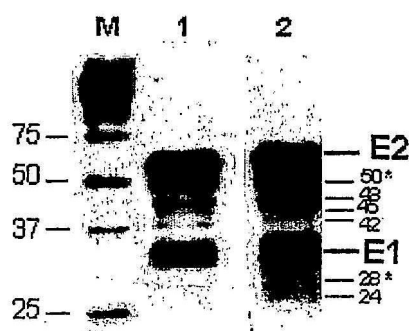


Figura 3B

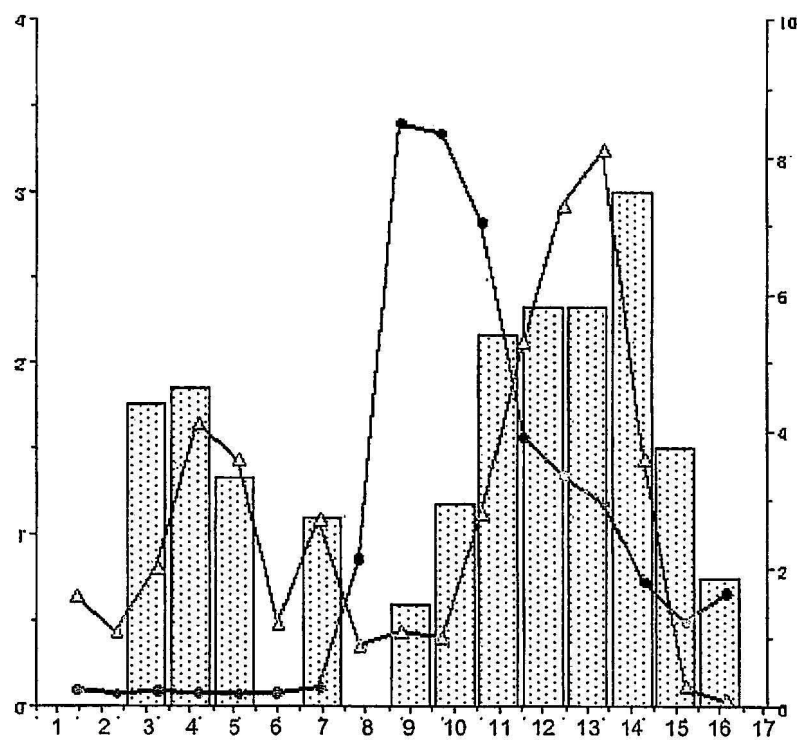


Figura 4

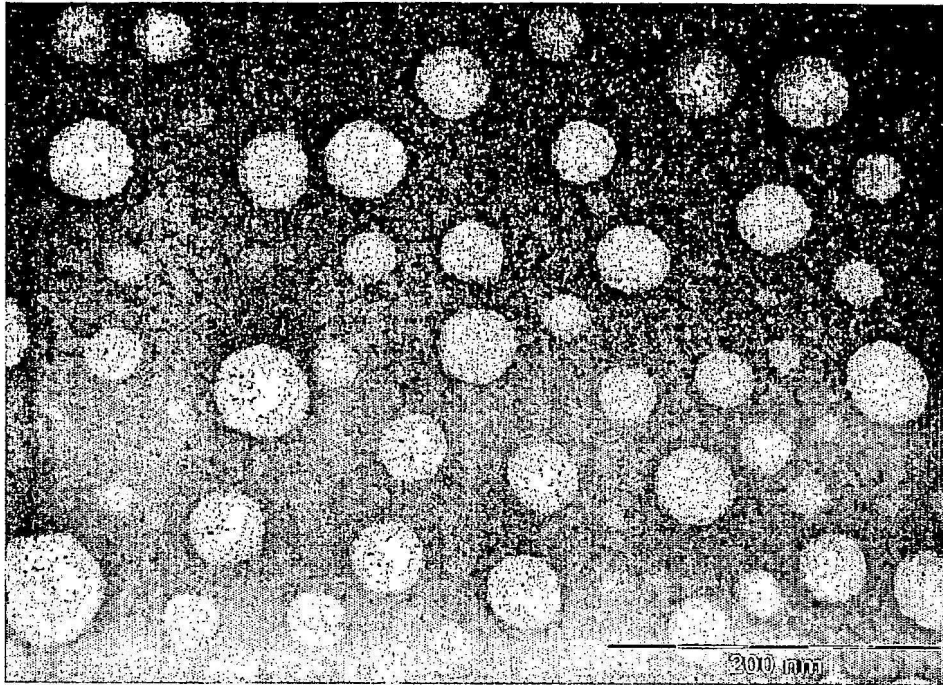


Figura 5A

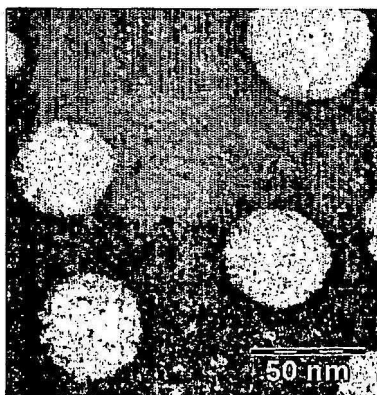


Figura 5B

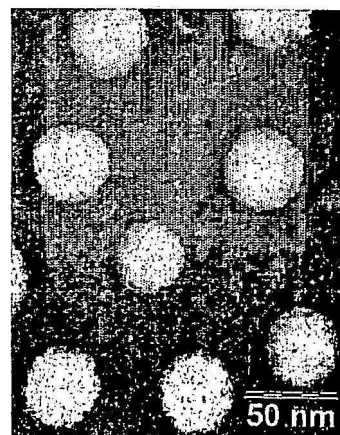


Figura 5C

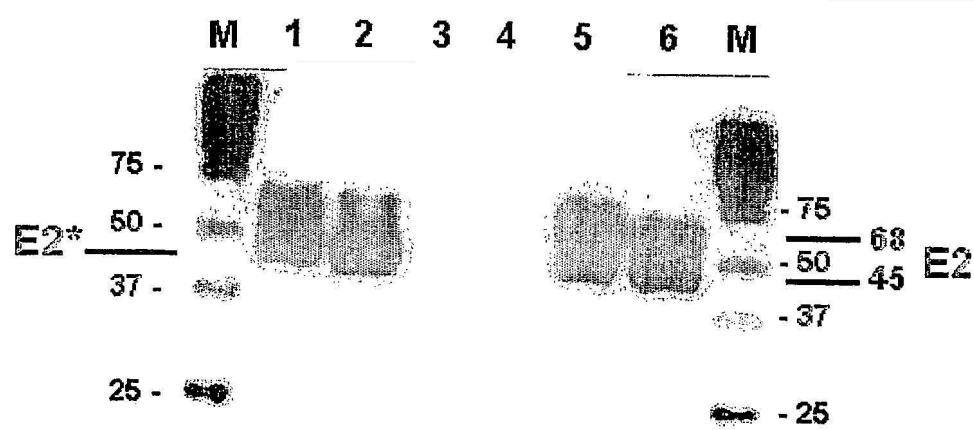


Figura 6

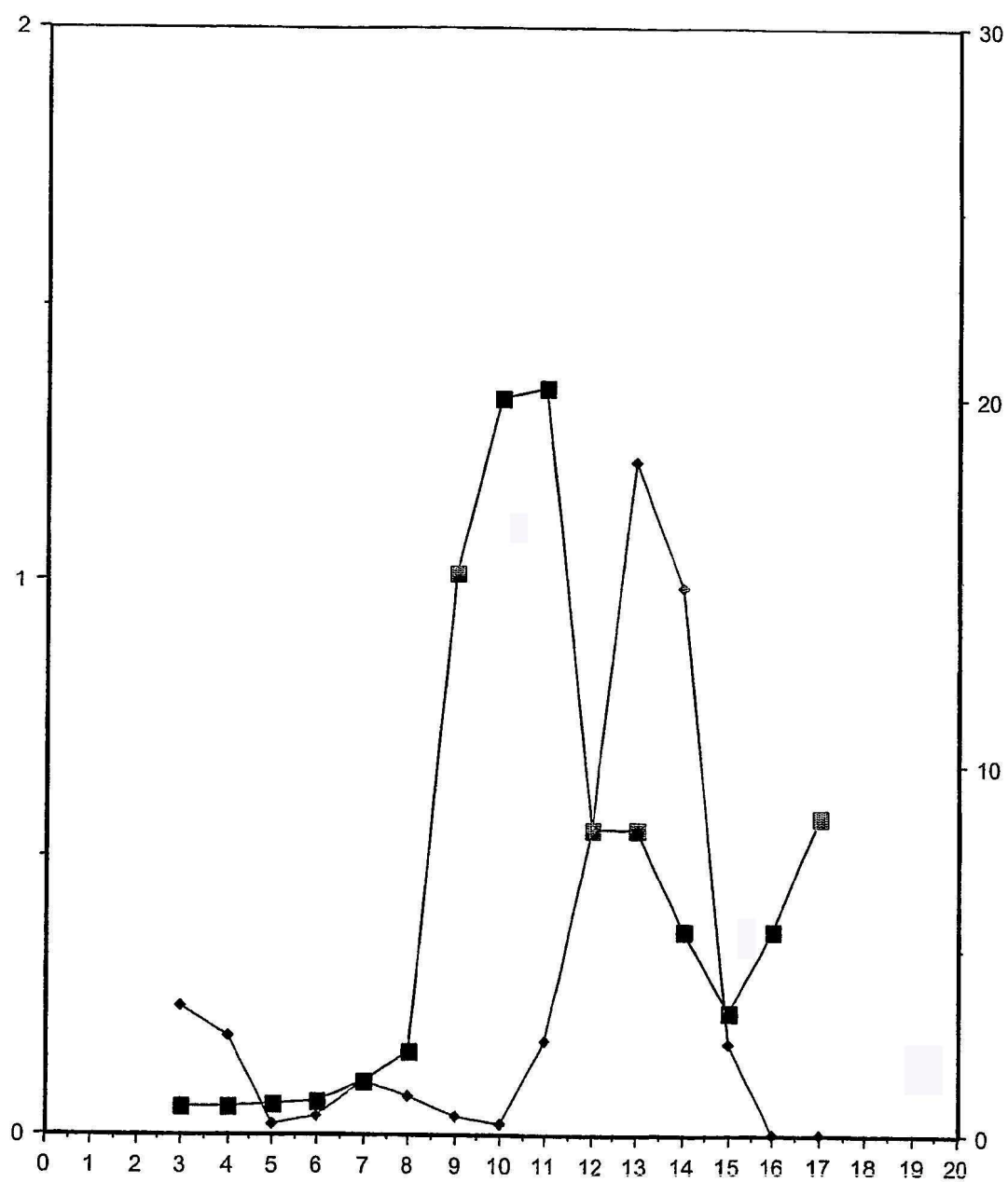


Figura 7

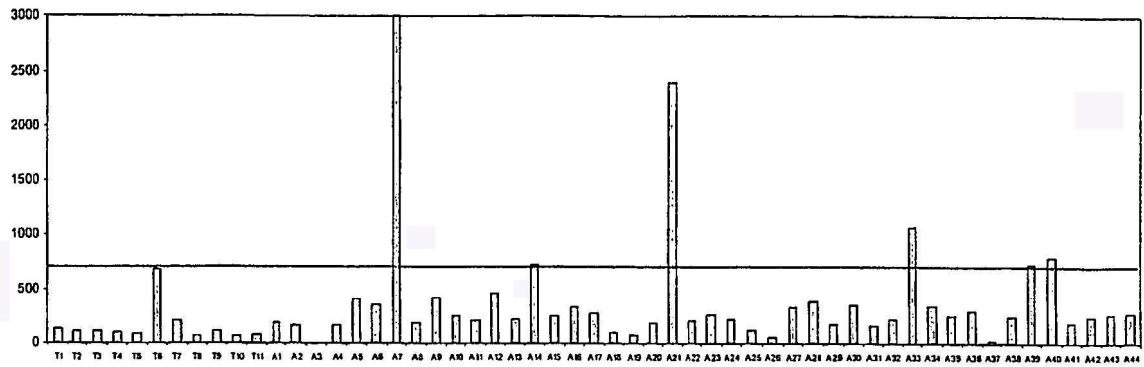


Figura 8A

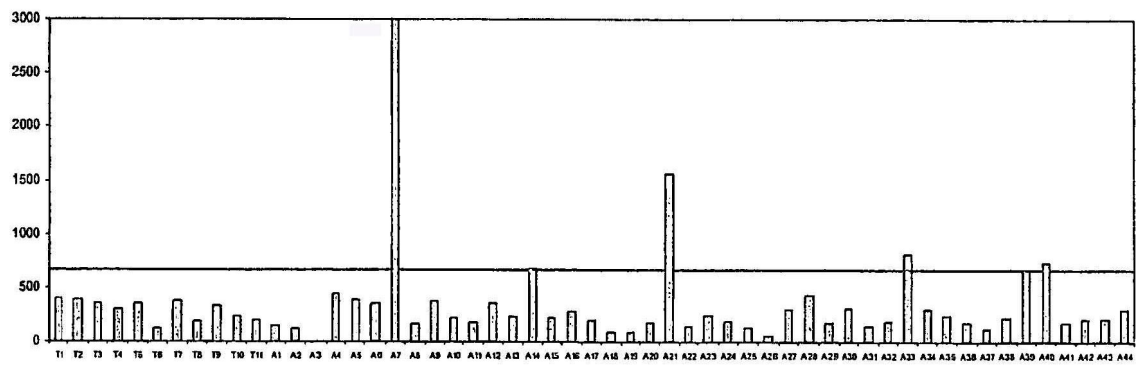


Figura 8B

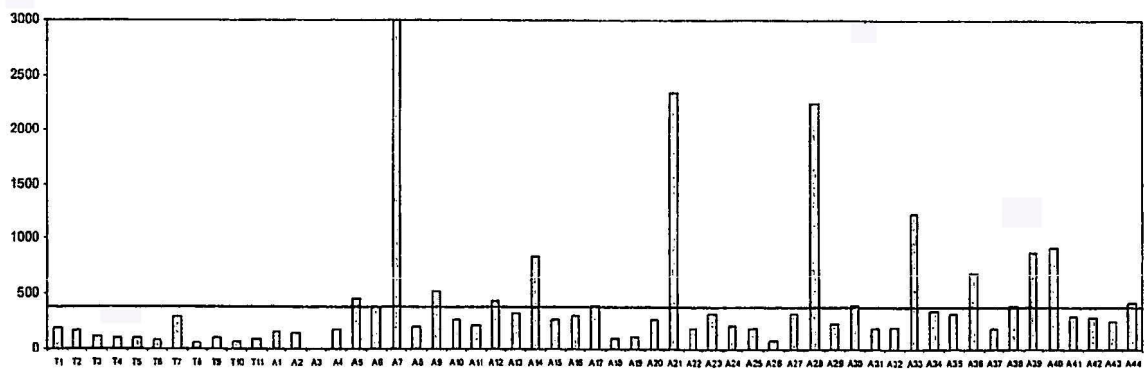


Figura 8C

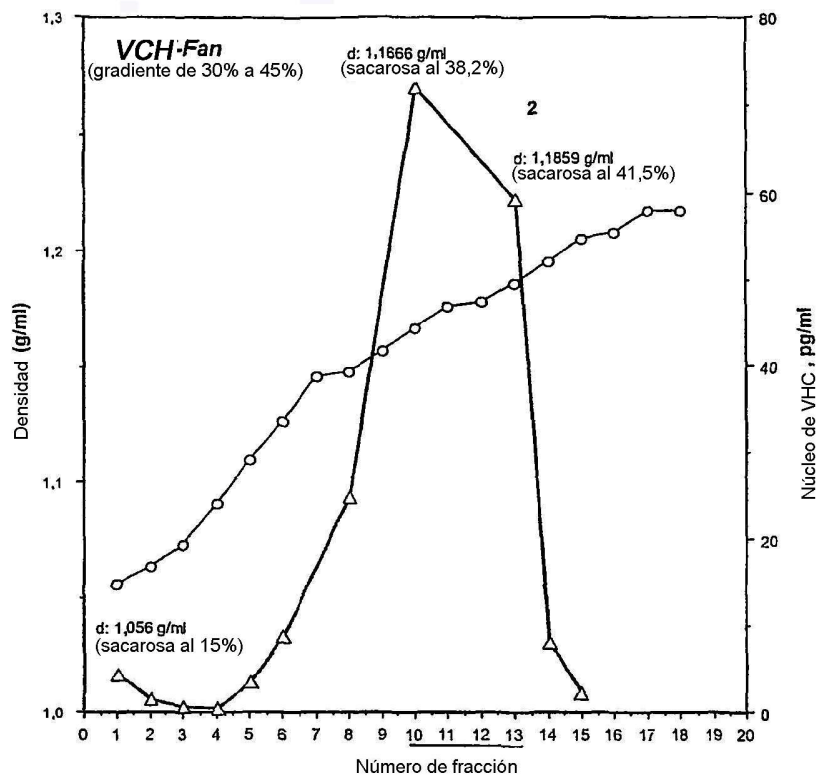


Figura 9A

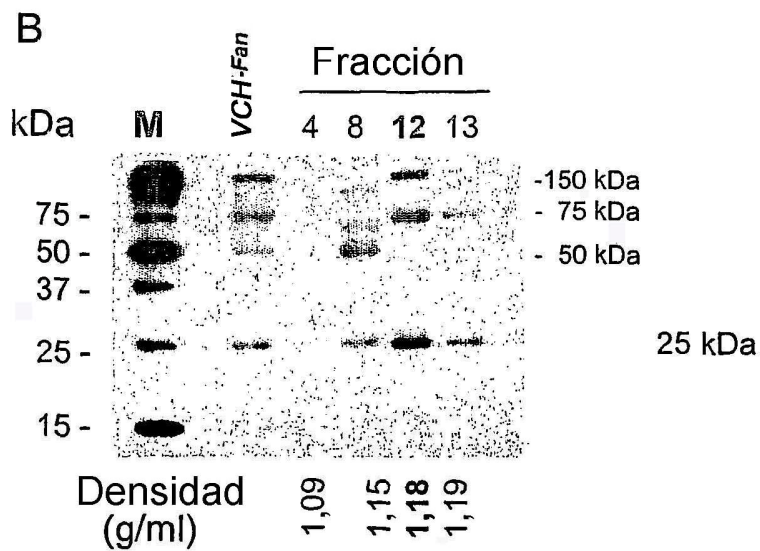


Figura 9B

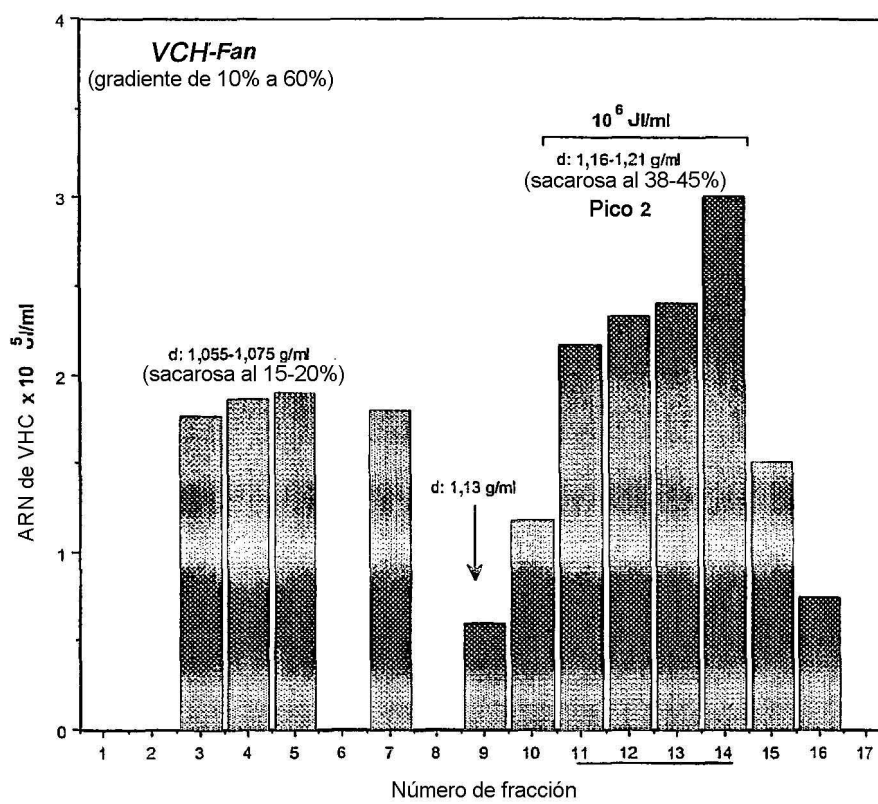


Figura 10

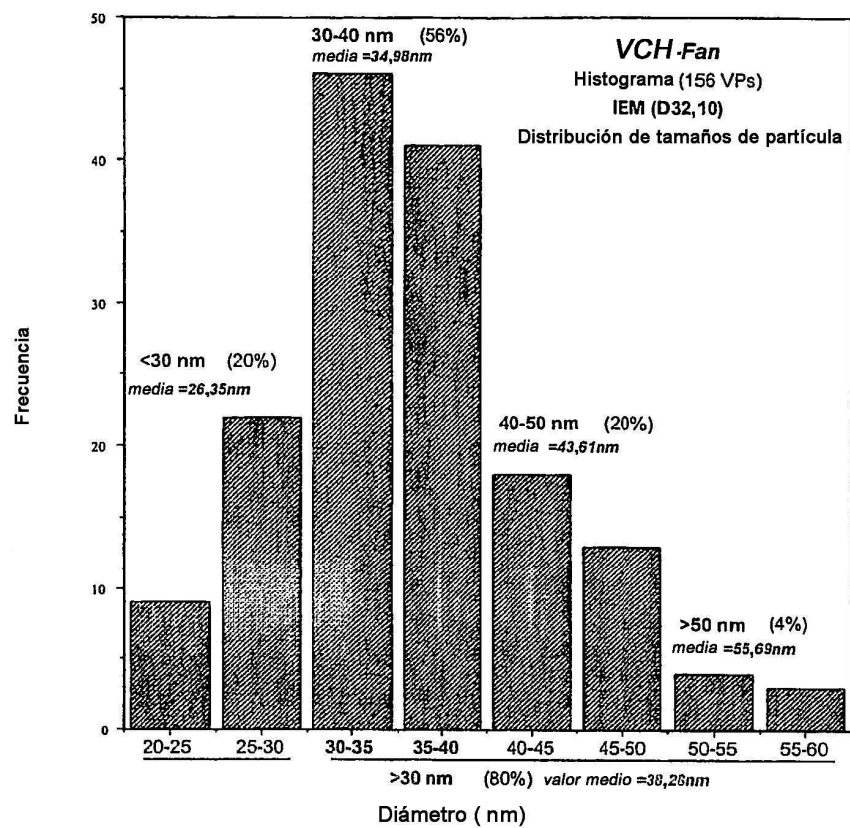


Figura 11A

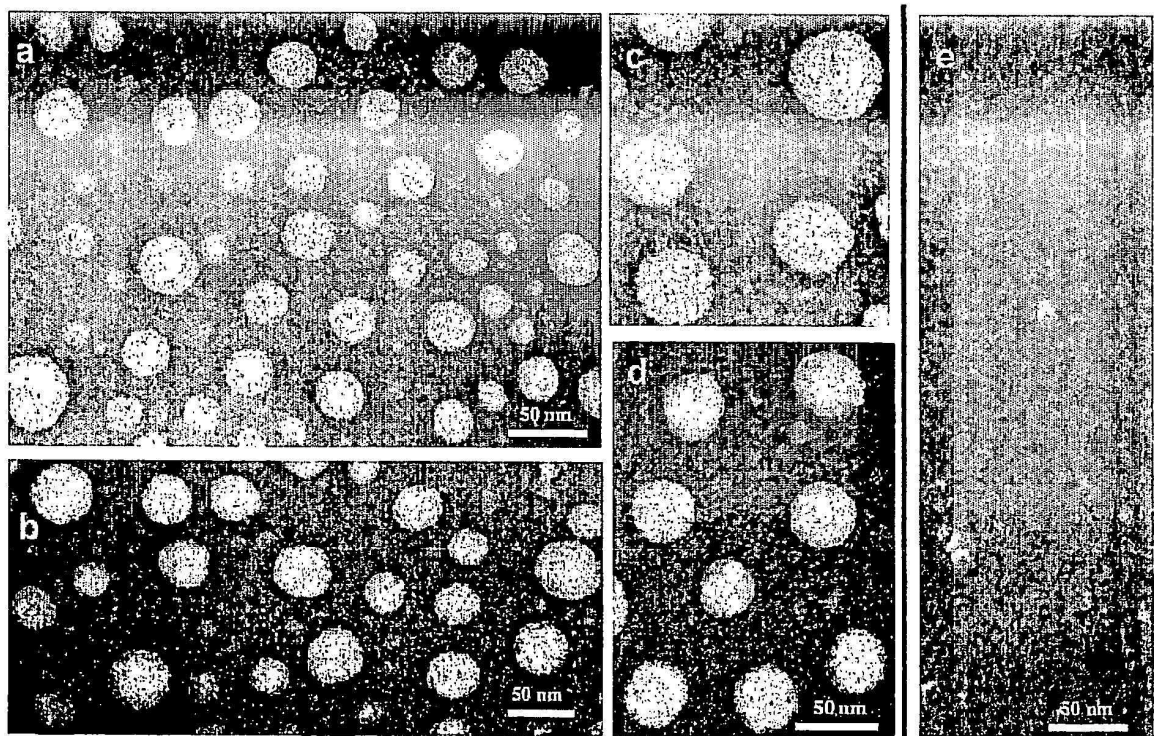


Figura 11B

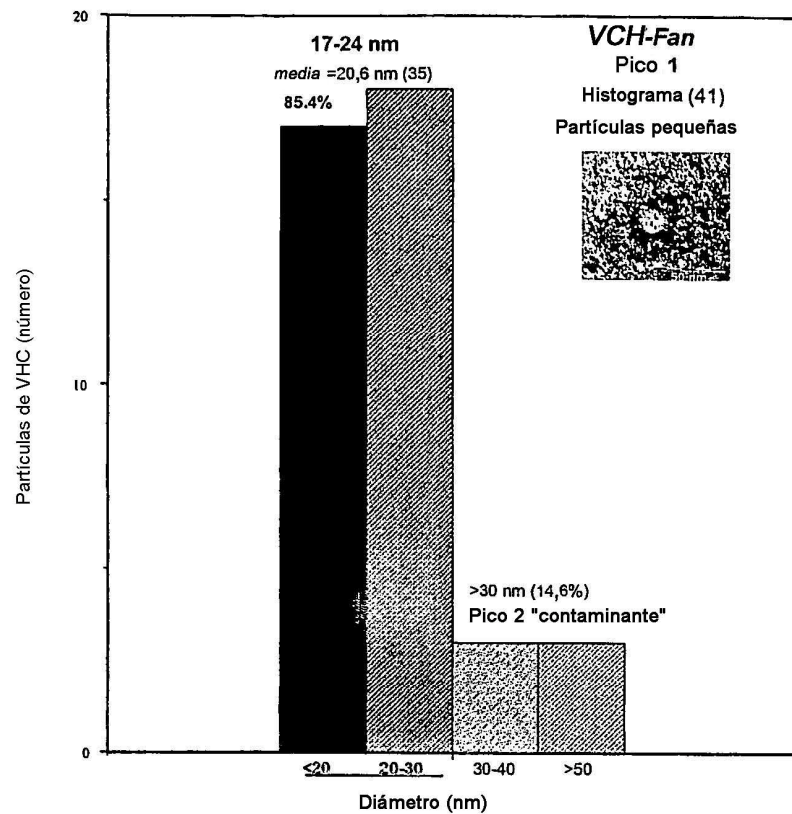


Figura 12A

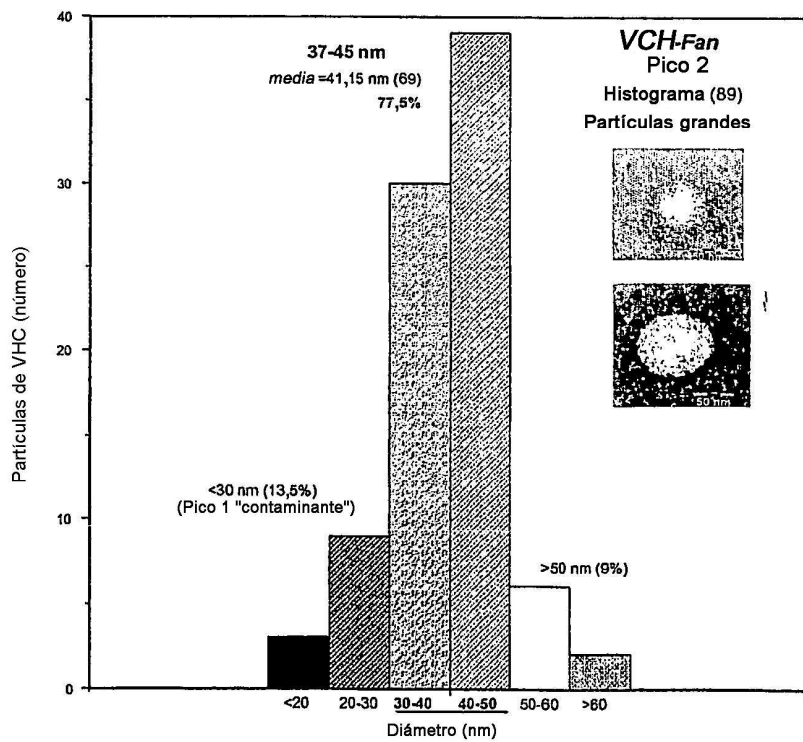


Figura 12B

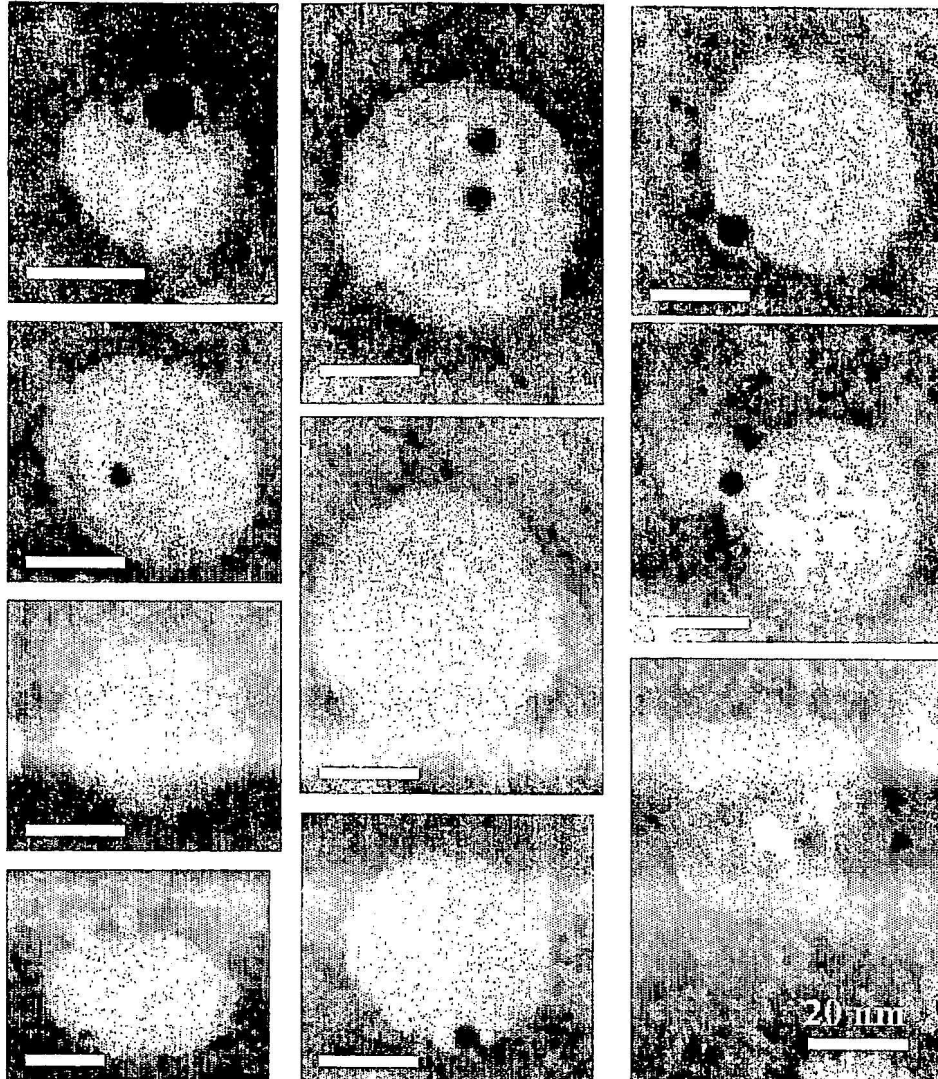


Figura 13

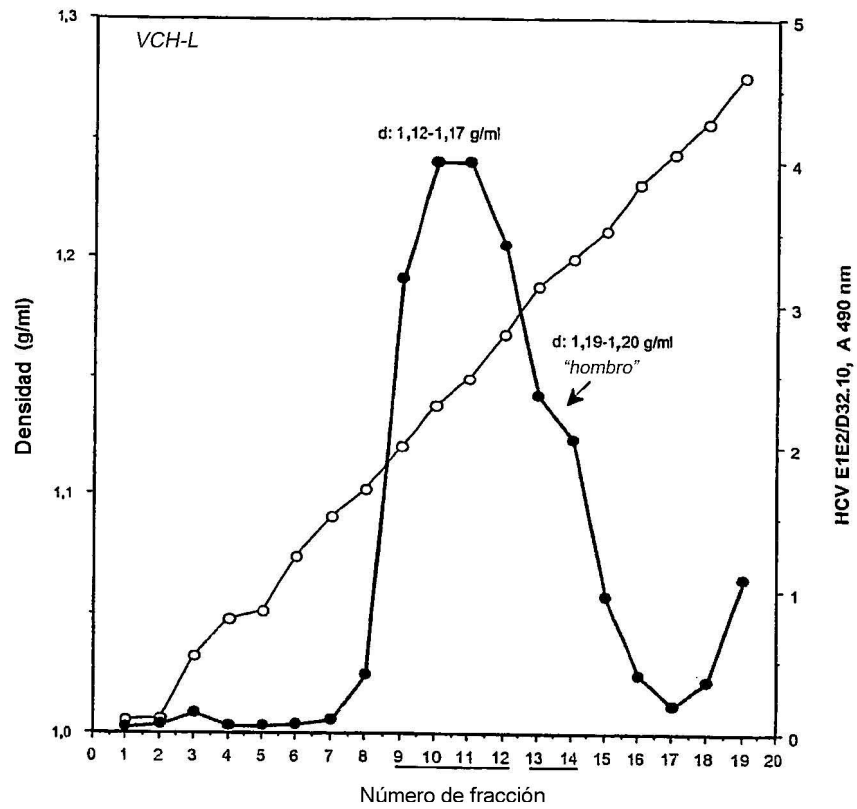


Figura 14A

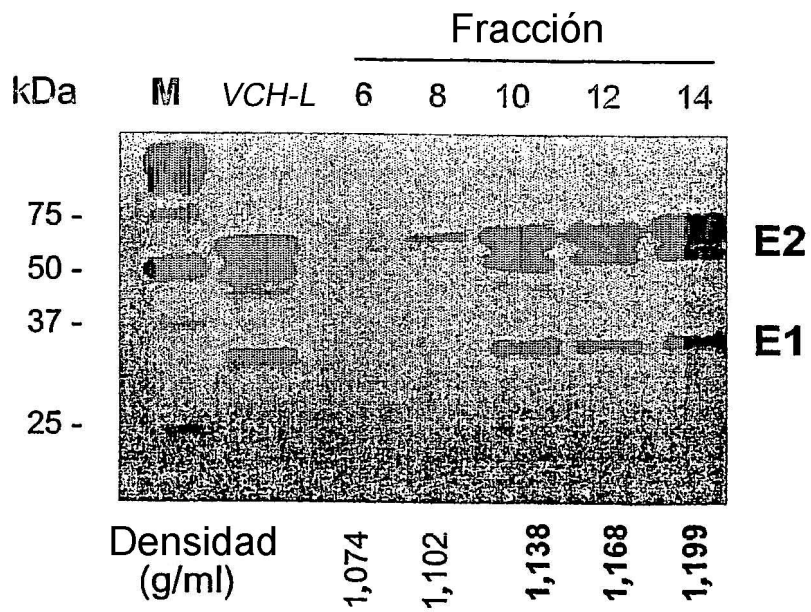


Figura 14B

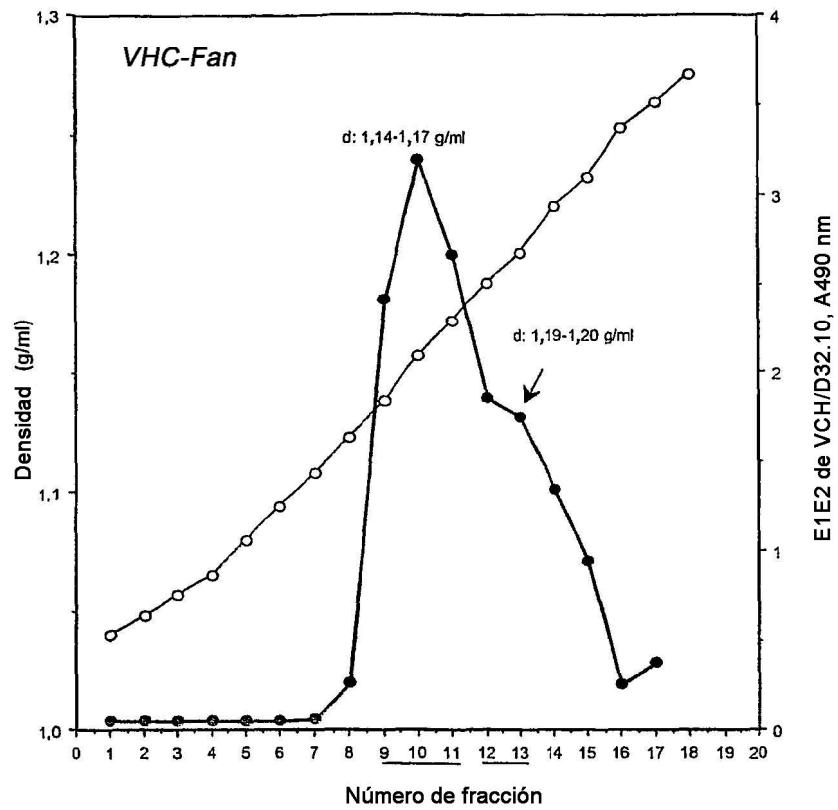


Figura 14C

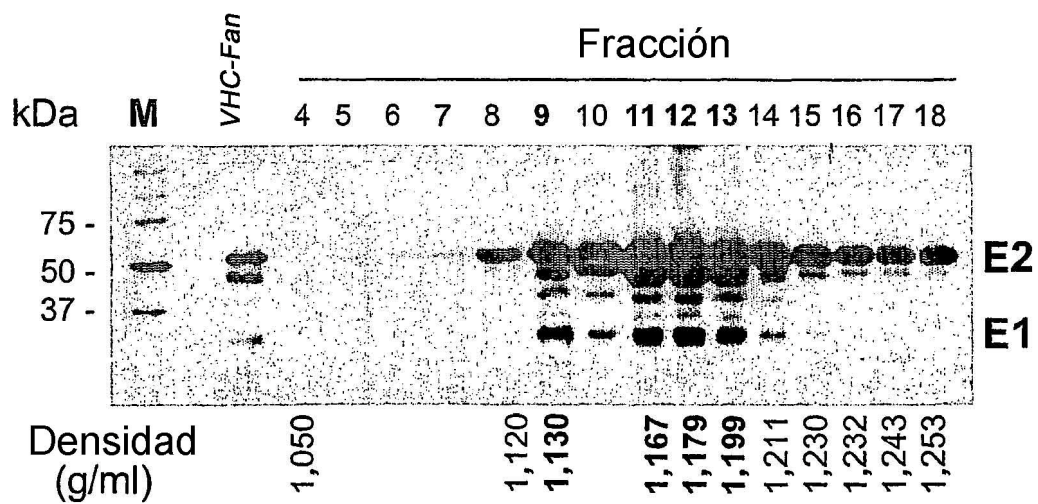


Figura 14D

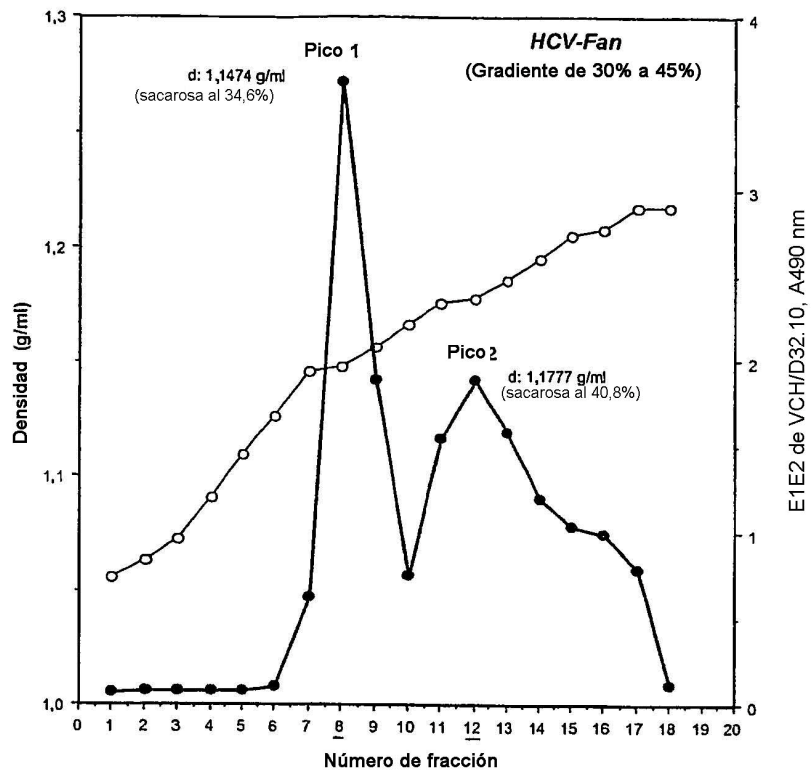


Figura 15A

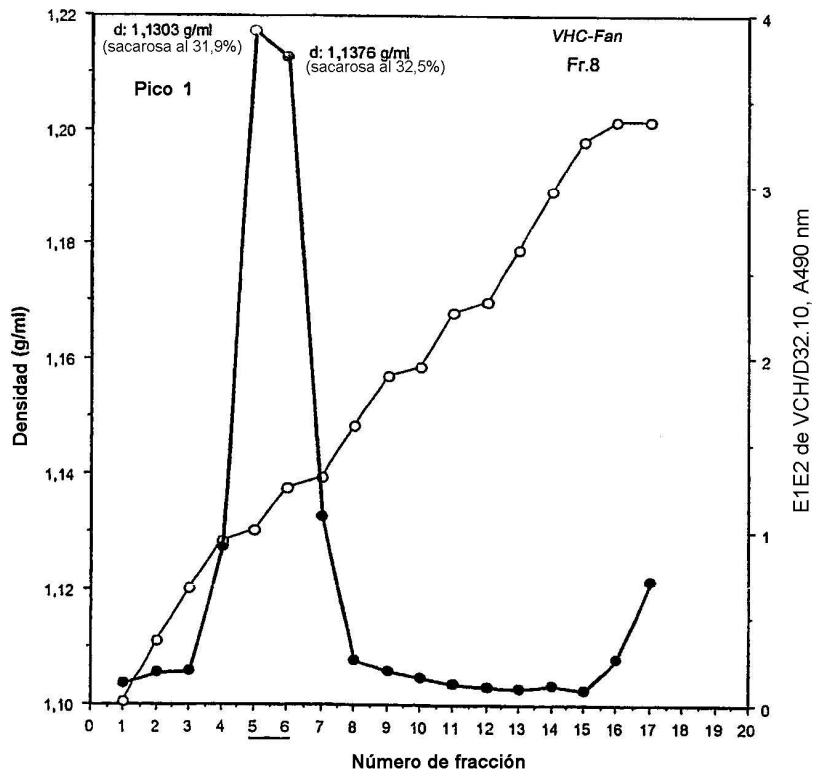


Figura 15B

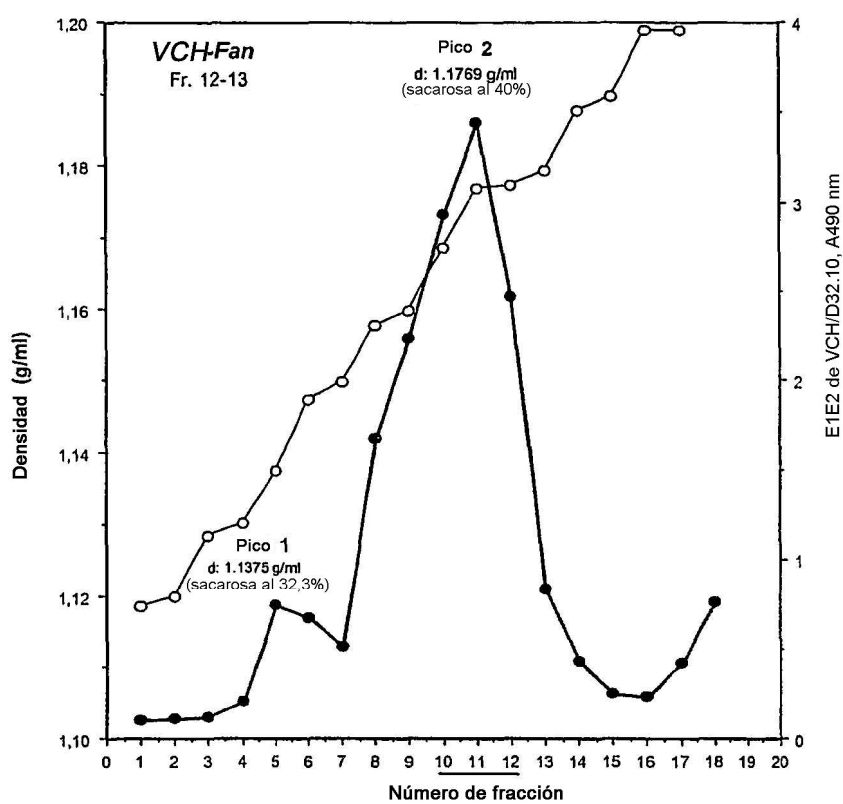


Figura 15C