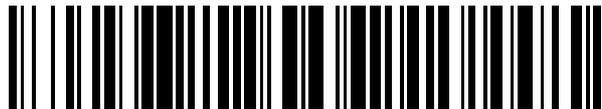


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 963**

51 Int. Cl.:

C07K 14/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01420103 .2**

96 Fecha de presentación: **09.05.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1256804**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2002**

54 Título: **Expresión de HBcAg y utilidades terapéuticas y de diagnóstico**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

03.01.2013

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

03.01.2013

73 Titular/es:

**BIO MERIEUX (100.0%)
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY L'ETOILE, FR**

72 Inventor/es:

**LETOURNEUR, ODILE y
WATELET, BÉNÉDICTE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 393 963 T3

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

DESCRIPCIÓN

Expresión de HBcAg y utilizaciones terapéuticas y de diagnóstico.

5 El virus de la hepatitis B (VHB) es el más importante de los virus hepatotróficos en cuanto al número de personas infectadas de manera crónica y la gravedad de las complicaciones de la infección. Es una causa principal de la enfermedad renal humana que puede conducir a infección crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular, dando como resultado más de un millón de muertes en todo el mundo cada año.

10 El VHB es un virus de ADN bicatenario que puede tener hasta el 20% o más de la población aparentemente sana en determinadas partes del mundo, tales como África, Asia y la región del Pacífico (Principles and Practice of Clinical Virology, 3^{era} edición, capítulo 2: Hepatitis Viruses, págs. 162-180). Se estima que el reservorio de portadores en todo el mundo es de un número superior a los 300 millones. Originalmente se pensaba que el VHB se propagaba exclusivamente mediante la sangre y productos sanguíneos, aunque ahora parece que el VHB también puede transmitirse mediante contacto íntimo, tal como contacto sexual y pueden ser posibles otras vías. Por tanto, la transmisión de la infección puede resultar de la inoculación accidental de cantidades mínimas de sangre, o fluido contaminado con sangre, durante procedimientos médicos, quirúrgicos y dentales; la inmunización con jeringas y agujas esterilizadas de manera inadecuada; la toxicomanía intravenosa o percutánea; tatuajes; perforaciones en la oreja, nariz y otras; la acupuntura; accidentes de laboratorio; y la inoculación accidental con cuchillas y objetos similares que se han contaminado con sangre.

25 Se han clonado los genomas de una variedad de aislados de VHB y se ha determinado la secuencia de nucleótidos completa de los mismos. Aunque hay alguna variación en la secuencia (hasta aproximadamente el 12% de los nucleótidos) entre estos aislados, se conservan la organización genética y otras características esenciales. El genoma presenta alrededor de 3200 pares de bases de longitud y el análisis del potencial de codificación de proteína revela cuatro ORF conservados. Los cuatro ORF están ubicados en la misma cadena de ADN y las cadenas del genoma se han designado por consiguiente como positiva (cadena incompleta) y negativa (cadena completa).

30 El VHB pertenece a la familia de *hepadnaviridae* y consiste en una envoltura externa de lípidos derivados del huésped que contienen un antígeno de superficie codificado por virión (HBsAg). Esta cubierta de lipoproteína de 42 nm rodea una nucleocápside icosaédrica ensamblada a partir del antígeno central (HBcAg) que contiene el ADN genómico viral y la polimerasa viral (para revisión, véase Nassal y Schaller, 1993). La proteína central es el producto citoplásmico del gen C, compuesto por 183 ó 185 residuos de aminoácido (21 kDa) dependiendo de serosubtipos, que puede dividirse en un dominio de ensamblaje N-terminal (residuos 1-149) y un dominio C-terminal similar a protamina muy básico (residuos 150-185), responsables respectivamente de la polimerización en partículas y el empaquetamiento de ARN. La proteína HBc presenta la capacidad de formar homodímeros unidos por disulfuro que se ensamblan espontáneamente para dar partículas (Zhou y Standing, 1992).

40 El HBcAg es un inmunógeno muy poderoso que induce respuestas humorales, de células T cooperadoras (Th) y células T citotóxicas (CTL) fuertes y que funciona como antígeno tanto dependiente de células T como dependiente de células T (Milich *et al.*, 1997a, b). Prácticamente en todos los individuos infectados aparecen anticuerpos anti-HBc. Se producen muy pronto tras la infección y pueden detectarse pocos días tras la detección de HBsAg en la sangre de sujetos infectados. Además, en infecciones agudas, el HBsAg disminuye a lo largo de un periodo de varias semanas y se reemplaza mediante niveles detectables del anticuerpo anti-HBsAg (anti-HBs). Durante un periodo "de ventana", en el que no es detectable ni HBsAg ni su anticuerpo homólogo, el anticuerpo anti-HBc puede ser el único marcador serológico detectable de la infección por VHB. Además, el anticuerpo anti-HBc persiste habitualmente mucho más que cualquier otro marcador de VHB. Por tanto, el anticuerpo anti-HBc es el marcador más útil para el diagnóstico de una infección por VHB en curso o pasada y para fines epidemiológicos.

50 Estudios intensivos han mostrado que HBcAg puede producirse en una variedad de sistemas de expresión heterólogos incluyendo *E. coli* y experimenta un plegado correcto y autoensamblaje para formar partículas centrales similares a cápsides nativas (Pasek *et al.*, 1979; Cohen y Richmond, 1982; Naito *et al.*, 1997; Wizeman y von Brunn, 1999). Las moléculas de HBc expresadas de manera bacteriana se ensamblan para dar partículas de dos tamaños dispuestas respectivamente con una simetría icosaédrica de número de triangulación T=3 (90 dímeros) o T=4 (120 dímeros) (Crowther *et al.*, 1994; Wingfield *et al.*, 1995). Las implicaciones fisiológicas de este cambio dimórfico no están claras, aunque se notifica que la forma T=4 supera en número a la forma T=3 en ~13 a 1 en cápsides aisladas del hígado humano (Kenney *et al.*, 1995). La estructura de cristal de la cápside T=4 de la proteína truncada expresada de manera bacteriana (aa 1-149) se ha resuelto mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 3,3 Å (Wynne *et al.*, 1999). El pliegue de monómero se caracteriza por cuatro hélices α y la ausencia de láminas β . De acuerdo con análisis bioquímicos previos, los datos estructurales revelaron dos regiones requeridas para la dimerización de monómeros centrales y para el ensamblaje posterior de los dímeros para dar partículas centrales (Wynne *et al.*, 1999). HBcAg también se produce en *Pichia pastoris* (Rolland *et al.*, Journal of Chromatography 8,753 (2001) 51-65).

65

Se han descrito muchos procedimientos diferentes para purificar HBcAg. Los procedimientos de purificación comunes se basan en la sedimentación de las partículas centrales en gradientes de sacarosa que no permiten la eliminación de todo el material de *E. coli* contaminante y están a menudo asociados con un bajo rendimiento. Como consecuencia, la mayoría de los sistemas de detección de anticuerpo anti-HBc disponibles comercialmente son inmunoensayos basados en inhibición o competencia, en los que los anticuerpos anti-HBc humanos inhiben a un anticuerpo anti-HBc marcado de unirse a un HBcAg recombinante inmovilizado (Pujol *et al.*, 1994). En consecuencia, la presencia de anti-HBc en la muestra genera un valor de señal bajo, mientras que su ausencia da como resultado un valor de señal alto. Este formato de prueba convencional evita la necesidad de HBcAg altamente purificado, pero presenta posibles inconvenientes que incluyen una escasa especificidad y una escasa reproducibilidad especialmente cerca del punto de corte del ensayo (Dodd y Popovsky, 1991). Se ha atribuido la reactividad del anticuerpo anti-HBc falso positivo a los anticuerpos que producen reacciones cruzadas o sustancias de interferencia en suero humano (Robertson *et al.*, 1991). Se ha mostrado que el pretratamiento de muestras de suero con agentes reductores podría mejorar significativamente la especificidad de la determinación de anticuerpo anti-HBc en ensayo competitivo (Robertson *et al.*, 1991; Spronk *et al.*, 1991; Weare *et al.*, 1991). El documento WO99/06837 da a conocer un complejo de HBcAg y albúmina para detectar anticuerpos anti-HBcAg. Sin embargo, con el fin de evitar mediciones adicionales muy costosas en diagnóstico de rutina y desechar donaciones de sangre debido a resultados de anticuerpo anti-HBc (falso) positivo, todavía existe una necesidad de aumentar la especificidad de la prueba.

Sumario de la invención

En un intento por mejorar la producción de un antígeno recombinante de alta calidad, altamente purificado, para su utilización en el diagnóstico de anticuerpos anti-HBc en muestras biológicas, se expresó HBcAg en levadura. Se caracterizó la proteína recombinante altamente purificada y se evaluó su idoneidad como antígeno de diagnóstico, a modo de ejemplo, en un nuevo inmunoensayo de enzima (EIA) de tipo sándwich en el que se capturaron anticuerpos anti-HBc mediante la unión a HBcAg recombinante en una fase sólida y luego se detectaron utilizando HBcAg recombinante marcado con un marcador apropiado.

Tal como se explicó anteriormente en la presente memoria, se conocen en la técnica ensayos para el diagnóstico de la posible presencia de VHB en un paciente, tal como se indica mediante la presencia de anticuerpos anti-HBc. Sin embargo, se cree que tales ensayos no son suficientemente sensibles y específicos y existe una necesidad para la producción de un HBcAg recombinante de alta calidad que permita el desarrollo de pruebas fiables, en particular ensayos de tipo sándwich.

En consecuencia, se da a conocer un sistema o casete de expresión que es funcional en una célula derivada de una levadura seleccionada de entre el grupo que consiste en la cepa *Pichia* y *Schizosaccharomyces*, especialmente seleccionada del grupo que consiste en *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* y *Schizosaccharomyces pombe* y que permite la expresión de ADN de HBc o fragmentos del mismo que codifica para HBcAg o fragmentos del mismo, puestos bajo el control de los elementos necesarios para su expresión. Un gran número de estas células están disponibles comercialmente en colecciones tales como ATCC (Rockville, MD, USA) y AFRC (Agriculture and Food Research Council, Norfolk, UK). Para el fin de la presente invención, dicha célula puede ser de tipo natural o de tipo mutante. El casete de expresión tal como se describió anteriormente comprende elementos necesarios para la expresión de HBcAg o fragmentos del mismo en las células consideradas. La expresión "componentes necesarios para la expresión" significa todos los elementos que permiten la transcripción de un ADN o fragmento de ADN en ARNm y la traducción del último en proteína. Entre éstos, la región promotora es de especial importancia. La región promotora puede ser autóloga, es decir, la región promotora del gen C de VHB, o heteróloga, es decir, la región promotora puede corresponder a un promotor de un plásmido o promotor de un gen en la célula huésped. Puede ser constitutiva, es decir puede permitir un nivel de transcripción constante durante todo el ciclo celular. Sin embargo, puede ser ventajoso utilizar una región promotora regulable que haga posible variar los niveles de transcripción según las condiciones de cultivo o la fase de crecimiento celular dependiendo de la presencia de un inductor (activación de la transcripción) o de un represor (represión). Generalmente, las regiones promotoras regulables se derivan de genes regulables para los que los mecanismos de regulación pueden variar altamente. Por otro lado, un casete de expresión tal como se describió anteriormente puede, además, contener otros elementos que contribuyen a la expresión del ADN o fragmentos del mismo así como secuencias de activación de transcripción.

Se da a conocer un vector que comprende un casete de expresión tal como se describió anteriormente. Puede ser un vector de plásmido replicante antes de la integración de ADN o fragmentos del mismo. Puede ser un vector multicopia presente en entre aproximadamente 1 y 500 copias, preferiblemente entre 1 y 20 copias, en la célula huésped. Pueden mencionarse, a modo de ejemplo, los vectores derivados de pPIC3.5K (Invitrogen).

Se da a conocer una célula de levadura seleccionada del grupo que consiste en células de cepas *Pichia* y *Schizosaccharomyces*, especialmente seleccionada del grupo que consiste en *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* y *Schizosaccharomyces pombe* y que comprende un casete de expresión tal como se describió anteriormente o bien en forma integrada en el genoma celular o bien insertada en un vector.

Se dan a conocer HBcAg recombinante o fragmentos del mismo producidos mediante un casete de expresión, un vector o una célula tal como se describió anteriormente. Dentro del marco de la presente invención, pueden

modificarse *in vitro* HBcAg o fragmentos del mismo, especialmente mediante la adición o delección de grupos químicos, tales como fosfatos, azúcares o ácido mirístico para potenciar su estabilidad o la presentación de uno o más epítomos.

5 Se da a conocer la utilización del HBcAg recombinante o fragmentos del mismo tal como se describió anteriormente en el diagnóstico de anticuerpos anti-HBc en muestras que van a someterse a prueba. Con respecto al HBcAg recombinante expresado en células procariotas, tales como células de *E. coli*; la proteína recombinante o fragmentos tal como se describió anteriormente es particularmente interesante puesto que se produce en forma altamente purificada y no necesita etapas de purificación adicionales ni que requieren mucho tiempo puesto que la proteína está plegada, eso significa próxima a la forma nativa. En consecuencia, una prueba que utiliza la proteína tal como se describió anteriormente en el diagnóstico de anticuerpos anti-HBc en una muestra que va a someterse a prueba es más fiable, más específica y más sensible. La proteína tal como se describió anteriormente es particularmente atractiva en el procedimiento de tipo sándwich. En los siguientes ejemplos, se hace la comparación entre HBcAg expresado en células de *E. coli* y HBcAg expresado en *Pichia*, cuando se utiliza en una prueba de diagnóstico.

15 Se da a conocer un reactivo para la detección y/o la monitorización de una infección por VHB, que comprende, como sustancia reactiva la proteína recombinante o fragmentos de la misma tal como se describió anteriormente. El reactivo anterior está unido o se unirá directa o indirectamente sobre un soporte apropiado. El soporte puede estar, sin limitación, en forma de un cono, un tubo, un pocillo, perlas o similares. El término "soporte sólido" tal como se utiliza en la presente memoria incluye todos los materiales sobre los que puede inmovilizarse un reactivo para su utilización en pruebas de diagnóstico. Pueden utilizarse materiales naturales o sintéticos, modificados químicamente o de otro modo, como soporte sólido, especialmente polisacáridos tales como materiales de celulosa, derivados de celulosa; polímeros tales como poliestireno, poliacrilato, polietileno, cloruro de vinilo o copolímeros tales como polímero de propileno y cloruro de vinilo, polímero de cloruro de vinilo y acetato de vinilo; copolímeros a base de estireno; fibras naturales y fibras sintéticas. Preferiblemente, el soporte es un polímero de poliestireno o un copolímero de butadieno-estireno. La unión del reactivo sobre el soporte sólido puede realizarse de manera directa o indirecta. Se conocen bien todas las técnicas para la unión de un reactivo sobre un soporte sólido.

30 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de anticuerpos anti-HBc en una muestra biológica que va a someterse a prueba, tal como sangre, plasma o suero, de un individuo o de un animal que es probable que esté o que se haya infectado por VHB según las reivindicaciones 1 ó 2.

35 Se da a conocer un procedimiento para la detección de anticuerpos anti-HBc en una muestra biológica que va a someterse a prueba, tal como sangre, plasma o suero, de un individuo o de un animal que es probable que esté infectado o que haya sido infectado por VHB, según el cual se llevan a cabo por lo menos las siguientes etapas:

- se prepara una mezcla que comprende:

- 40 (i) un reactivo tal como se definió anteriormente que está inmovilizado o se inmovilizará sobre un soporte sólido,
 (ii) la muestra que va a someterse a prueba que comprende, si están presentes, anticuerpos anti-HBc,
 (iii) un ligando marcado que podrá reaccionar con los anticuerpos anti-HBc de la muestra;

45 - se incuba la mezcla durante un tiempo predeterminado;

- se separa la fase sólida de la fase líquida; y

50 - se revela la posible presencia de anticuerpos anti-HBc midiendo el nivel de marcaje en la fase sólida.

Este procedimiento denominado "ensayo de tipo sándwich" puede realizarse en una o más etapas y el ligando es o bien un HBcAg recombinante marcado tal como se describió anteriormente o bien una antiinmunoglobulina marcada.

55 Se da a conocer un procedimiento para la detección de anticuerpos anti-HBc en una muestra biológica que va a someterse a prueba, tal como sangre, plasma o suero, de un individuo o de un animal que es probable que esté infectado o que haya sido infectado por VHB, según el cual se llevan a cabo por lo menos las siguientes etapas:

- se prepara una mezcla que comprende:

- 60 (i) un reactivo tal como se definió anteriormente que está inmovilizado o se inmovilizará sobre un soporte sólido,
 (ii) la muestra que va a someterse a prueba que comprende, si están presentes, anticuerpos anti-HBc,
 (iii) anticuerpos anti-HBc marcados que podrán reaccionar con el reactivo;

65 - se incuba la mezcla durante un tiempo predeterminado;

- se separa la fase sólida de la fase líquida; y
- se revela la posible presencia de anticuerpos anti-HBc midiendo el nivel de marcaje en la fase sólida.

5

Este procedimiento se denomina "ensayo de competencia".

Puesto que HBcAg es un inmunógeno muy poderoso que induce una respuesta humoral fuerte, el HBcAg recombinante tal como se describió anteriormente se utiliza para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos de los mismos obtenidos mediante la reacción inmunológica de un organismo animal, preferiblemente un ratón, una rata o un conejo con un agente inmunógeno que consiste en el HBcAg recombinante o fragmentos del mismo tal como se describió anteriormente. La producción de anticuerpos policlonales y monoclonales forma parte del conocimiento general de los expertos en la materia. A modo de referencia, puede mencionarse Köhler G. y Milstein C. (1975) y Galfre G. *et al.* (1977) para la producción de anticuerpos monoclonales y Roda A., Bolelli G.F. (1980), para la producción de anticuerpos policlonales. Los anticuerpos también pueden producirse inmunizando ratones, rata o conejo con el HBcAg o fragmentos del mismo tal como se describió anteriormente. Para la producción de anticuerpos monoclonales, el inmunógeno puede acoplarse a hemocianina de lapa californiana (péptido KLH) como soporte para la inmunización o a albúmina sérica (péptido SA). Los animales se someten a una inyección de inmunógeno utilizando adyuvante de Freund completo. Se analizan los sueros y los sobrenadantes de cultivo de hibridoma derivados de los animales inmunizados para determinar su especificidad y su selectividad, utilizando técnicas convencionales tales como, por ejemplo, ensayos ELISA o inmunotransferencia de tipo Western. Se seleccionan los hibridomas que producen los anticuerpos más específicos y los más sensibles. También pueden producirse *in vitro* anticuerpos monoclonales mediante cultivo celular de los hibridomas producidos o recuperando fluido de ascitis tras inyección intraperitoneal de los hibridomas en ratones. Sea cual sea el procedimiento de producción, mediante sobrenadante o mediante ascitis, entonces se purifican los anticuerpos. Los procedimientos de purificación utilizados son esencialmente filtración en gel por intercambio iónico y cromatografía de exclusión o cromatografía de afinidad (proteína A o G). Se examina un número suficiente de anticuerpos en ensayos funcionales con el fin de identificar los anticuerpos más eficaces. Los expertos en la materia conocen bien la producción *in vitro* de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpo o de derivados de anticuerpo, tales como anticuerpos quiméricos producidos mediante ingeniería genética.

10

15

20

25

30

35

Más particularmente, el término "fragmento de anticuerpo" pretende significar fragmentos F(ab)₂, Fab, Fab' y sFv (Blazar *et al.*, (1997) y Bird *et al.*, (1988,)) de un anticuerpo nativo, y el término "derivado" pretende significar, entre otros, un derivado quimérico de un anticuerpo nativo (véase, por ejemplo, Arakawa *et al.*, (1966) y Chaudray *et al.*, (1989)).

40

El anticuerpo monoclonal o policlonal así obtenido se incorpora en una composición de diagnóstico que se utiliza en un procedimiento para detectar por lo menos la proteína HBc en una muestra biológica tras el pretratamiento, si es necesario, de la muestra para romper las células y liberar la proteína HBc, según el cual la muestra biológica se pone en contacto con dicha composición de diagnóstico en condiciones predeterminadas que permiten la formación de complejos anticuerpo/antígeno y se detecta la formación de dichos complejos. Dicha composición también puede comprender por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o los fragmentos del mismo, dirigidos contra la proteína HBsAg.

45

Se da a conocer un procedimiento de tipo sándwich o competencia para detectar por lo menos la proteína HBc en una muestra biológica, si es necesario tras el pretratamiento de la muestra, para romper las células y liberar la proteína HBc, utilizando dichos procedimientos preferiblemente por lo menos un anticuerpo monoclonal tal como se describió anteriormente.

50

Se da a conocer un procedimiento de tipo sándwich que comprende por lo menos las siguientes etapas:

- se prepara una mezcla, que comprende:
 - (i) un reactivo que consiste en por lo menos un anticuerpo monoclonal tal como se describió anteriormente que está inmovilizado o se inmovilizará sobre un soporte sólido,
 - (ii) la muestra que va a someterse a prueba que comprende, si está presente, HBcAg,
 - (iii) un ligando marcado que podrá reaccionar con el HBcAg de la muestra;
- se incuba la mezcla durante un tiempo predeterminado;
- se separa la fase sólida de la fase líquida; y
- se revela la posible presencia de HBcAg midiendo el nivel de marcaje en la fase sólida. El ligando marcado puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

55

60

65

Se da a conocer un procedimiento de tipo sándwich que comprende por lo menos las siguientes etapas:

- se prepara una mezcla, que comprende:

(i) un reactivo que consiste en por lo menos un anticuerpo policlonal tal como se describió anteriormente que está inmovilizado o se inmovilizará sobre un soporte sólido,

(ii) la muestra que va a someterse a prueba que comprende, si está presente, HBcAg,

(iii) un ligando marcado que podrá reaccionar con el HBcAg de la muestra;

- se incuba la mezcla durante un tiempo predeterminado;

- se separa la fase sólida de la fase líquida; y

- se revela la posible presencia de HBcAg midiendo el nivel de marcaje en la fase sólida. El ligando marcado puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Se da a conocer un procedimiento de competencia que comprende por lo menos las siguientes etapas:

- se prepara una mezcla, que comprende:

(i) un reactivo que consiste en por lo menos un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal tal como se describió anteriormente que está inmovilizado o se inmovilizará sobre un soporte sólido,

(ii) la muestra que va a someterse a prueba que comprende, si está presente, HBcAg,

(iii) un ligando marcado que podrá reaccionar con el reactivo (i) y que consiste en un HBcAg recombinante tal como se describió anteriormente;

- se incuba la mezcla durante un tiempo predeterminado;

- se separa la fase sólida de la fase líquida; y

- se revela la posible presencia de HBcAg midiendo el nivel de marcaje en la fase sólida.

Puesto que HBcAg es un inmunógeno muy poderoso que induce una respuesta humoral fuerte, el HBcAg recombinante tal como se describió anteriormente puede utilizarse como componente activo de la respuesta inmunitaria. Por tanto, se da a conocer una vacuna contra el virus VHB. Esta vacuna se prepara según procedimientos ya conocidos utilizados para preparar vacunas disponibles comercialmente. Esta vacuna comprende por lo menos la proteína de HBcAg recombinante tal como se describió anteriormente o fragmentos de la misma. La proteína de HBcAg recombinante se obtiene utilizando un casete de expresión tal como se describió anteriormente.

Se da a conocer una composición inmunógena o de vacuna que es una composición que comprende una proteína de HBcAg recombinante o un fragmento de proteína tal como se definió anteriormente, combinada opcionalmente con un vehículo y/o adyuvante y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado. Las vacunas que comprenden la proteína de HBcAg o los fragmentos de la misma, se preparan de manera convencional y contienen una cantidad inmunoprotectora de la proteína de HBcAg o de los fragmentos de la misma, preferiblemente en una solución salina tamponada y se mezclan o adsorben utilizando adyuvantes conocidos tales como hidróxido o fosfato de aluminio.

El término "inmunoprotector" significa que se administra a un individuo una cantidad de la proteína de HBcAg recombinante tal como se describió anteriormente o de los fragmentos de la misma que es suficiente para inducir una producción de anticuerpos (respuesta inmunitaria humoral) que es suficiente para ser protectora o una respuesta inmunitaria mediada por células citotóxicas (respuesta inmunitaria celular), para conferir una protección contra el agente infeccioso sin inducir efectos secundarios. Los dos tipos de respuesta difieren en que los anticuerpos reconocen los antígenos en su forma tridimensional, mientras que las células citotóxicas reconocen partes de dichos antígenos, asociadas con glicoproteínas codificadas por el complejo de histocompatibilidad principal (MHC). Los linfocitos T citotóxicos (CTL) desempeñan un papel esencial en la defensa de células infectadas con virus. Actúan directamente mediante citotoxicidad, pero además proporcionando ayuda específica y no específica a otras células hematopoyéticas, tales como macrófagos, células B y otras células T. Las células infectadas transforman el antígeno a través de acontecimientos intracelulares que implican proteasas. El antígeno transformado se presenta entonces en la superficie de las células, en forma de péptidos unidos a moléculas HLA de clase I, a los receptores de células T en los CTL. Las moléculas del MHC de clase I también pueden unirse a péptidos exógenos y presentarlos a CTL sin transformación intracelular. Chisari *et al.*, (Microbiol. Pathogen. 6:31

(1989)) han sugerido que las lesiones del hígado podrían mediarse mediante una respuesta de células T citotóxicas CD8+ restringida a HLA de clase I a los antígenos codificados por VHB.

La cantidad de proteína de HBcAg tal como se describió anteriormente o fragmentos de la misma depende de si se añade o no adyuvante, pero generalmente está entre 10 y 50 µg/ml de proteína o de fragmento. Por tanto, comúnmente, se administran por dosis 20 µg/0,5 ml de proteína en adultos y 10 µg/0,5 ml en niños. Las vacunas también pueden comprender otras proteínas que potencian la respuesta inmunitaria. El HBcAg interacciona con determinadas proteínas de potenciación, preferiblemente una albúmina y/o una proteína estructural sin procesar de un virus de ARN de cadena positiva, para proporcionar un complejo compuesto por el HBcAg y la albúmina o proteína estructural sin procesar del virus de ARN de cadena positiva. Conforme a tal complejidad, se cree que HBcAg experimenta cambios conformacionales que potencian la antigenicidad del HBcAg en comparación con HBcAg solo en cuanto a tanto afinidad como especificidad. La proteína de HBcAg tal como se describió anteriormente o los fragmentos de la misma, también pueden mezclarse con HBsAg y/o proteínas Pre-S o fragmentos de dichas proteínas, para la formulación de una vacuna. También pueden mezclarse con partículas híbridas que portan epítomos de proteínas de otros organismos o con otros compuestos inmunógenos, para la formulación de vacunas bivalentes o multivalentes. La preparación de vacunas se describe en particular en "Vaccines", ed. Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Md., EE.UU., 1978.

La vacuna se administra a una dosis dada en una o más inyecciones intramusculares o subcutáneas, seguido por un(os) refuerzo(s), si es necesario. El efecto inmunizador de la vacuna se monitoriza sometiendo a ensayo anticuerpos anti-HBc en el individuo vacunado.

La administración de una(s) proteína(s) o un(os) péptido(s) derivado(s) de interés o el/los fragmento(s) de los mismos, solos o en combinación se utiliza para profilaxis y/o terapia. Estas proteínas o péptidos administrados se caracterizan porque no muestran la virulencia del VHB, pero pueden inducir una respuesta inmunitaria humoral o celular en el individuo al que se le administran. Tales proteínas se denominan "modificadas", pero se conserva su inmunogenicidad.

La identificación de una(as) proteína(s) o fragmento(s) de vacuna se lleva a cabo como sigue:

se analizan las moléculas candidatas "modificadas" en un ensayo funcional para estar seguros de que han perdido su toxicidad y para verificar su inmunogenicidad, (i) llevando a cabo un ensayo *in vitro* de proliferación de linfocitos T CD4+ específicos para el antígeno administrado (ensayo de células T) o un ensayo *in vitro* de citotoxicidad de los linfocitos CD8+ específicos para el antígeno administrado y (ii) midiendo, entre otros, el nivel de anticuerpos circulantes dirigidos contra la proteína natural. Estas formas modificadas se utilizan para inmunizar seres humanos utilizando procedimientos normalizados con adyuvantes adecuados.

Las vacunas preparadas son inyectables, es decir están en disolución líquida o en suspensión. Como opción, también puede emulsionarse la preparación. La molécula antigénica puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Ejemplos de excipientes favorables son agua, una solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o equivalentes, y combinaciones de los mismos. Si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes que tamponan el pH o adyuvantes tales como hidróxido de aluminio, dipéptido de muramilo o variaciones de los mismos. En el caso de los péptidos, su acoplamiento a una molécula más grande (KLH, toxina del tétano) a veces aumenta la inmunogenicidad. Las vacunas se administran de manera convencional mediante inyección, por ejemplo inyección intramuscular.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende significar los soportes y vehículos que pueden administrarse a seres humanos o a animales, tal como se describió, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a ed., Mack Publishing Co. El vehículo farmacéuticamente aceptable es preferiblemente isotónico, hipotónico o es débilmente hipertónico con una fuerza iónica relativamente baja. Las definiciones de los adyuvantes y excipientes farmacéuticamente aceptables también se proporcionan en Remington's Pharmaceutical Sciences mencionado anteriormente.

Se da a conocer una composición farmacéutica destinada para el tratamiento o para la prevención de una infección por VHB en un individuo o animales, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del casete de expresión, el vector o la célula tal como se definió anteriormente.

Finalmente, un procedimiento para la vacunación de un individuo (humano o animal) según una composición inmunoterapéutica activa, especialmente una preparación de vacuna, se inyecta al individuo tal como se definió anteriormente; y un procedimiento para el tratamiento o para la prevención de una infección por VHB en la que se administra al individuo una composición farmacéutica tal como se definió anteriormente (ser humano o animal).

La secuencia de péptidos de la figura 1A corresponde a una secuencia subtipo adw2, pero naturalmente el casete de expresión tal como se describió anteriormente permite la expresión de cualquier genotipo o subtipo.

Los ejemplos a continuación harán posible demostrar las características y ventajas de la presente invención en la que las siguientes abreviaturas significan:

5 amu, unidad de masa promedio; BMGY, medio convencional rico que contiene glicerol; BMMY, medio convencional rico que contiene metanol; ELISA, ensayo inmunoabsorbente unido a enzima; G418, genética; VHB, virus de la hepatitis B; HBcAg, antígeno central de VHB; HBeAg, antígeno e de VHB; HBsAg, antígeno de superficie de VHB; anticuerpo anti-HBc, anticuerpo frente a HBcAg; MALDI-TOF, desorción/ionización con láser asistida por matriz-tiempo de vuelo; Mut⁺, utilización de metanol de tipo natural; Mut^s, utilización de metanol más lenta.

10 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática de las secuencias de aminoácido de HBcAg expresadas en *P. pastoris* (yBW63) y en *E. coli* (bOL32). Las secuencias se muestran como líneas abiertas con el extremo N-terminal de HBcAg nativo (residuo 1) a la izquierda y el extremo C-terminal con su dominio de protamina (+++) a la derecha. Las dos proteínas recombinantes bOL32 y yBW63 difieren en la presencia de un tetrapéptido adicional (MRGS) en el extremo N-terminal y una secuencia de hexahistidina en el extremo C-terminal de bOL32.

Figura 2: Análisis SDS-PAGE de HBcAg recombinante expresado en *E. coli* y *P. pastoris*. Se resolvieron HBcAg recombinante purificado, yBW63 (carriles 1 y 3) y bOL32 (carriles 2 y 4) mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con azul Coomassie Brilliant (A) o inmunotransferencia utilizando un suero humano positivo para HBc (B). Se redujeron las muestras (carriles 1-2) o no se redujeron (3-4).

Figura 3: Microscopía electrónica que muestra partículas purificadas ensambladas a partir de proteínas de HBcAg yBW63 (A) o bOL32 (B). Las partículas purificadas se sometieron a examen mediante microscopio electrónico tras tinción negativa. La barra en la micrografía representa 100 nm.

Figura 4: Análisis de partículas centrales asociadas a nucleótido mediante electroforesis en gel de agarosa. Las proteínas purificadas yBW63 y bOL32 se trataron con ADNasa o ARNasa o con ambas nucleasas y se separaron mediante gel de agarosa (1%, p/v) teñido con bromuro de etidio (A) o azul Coomassie Brilliant (B) Sd, marcador de tamaño molecular Smart convencional de ADN (Eurogentec), carril 1, sin tratar, carril 2, tratado con ADNasa y ARNasa, carril 3, tratado con ARNasa, carril 4, tratado con ADNasa.

Ejemplos

35 1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Paneles de suero.

Se sometieron a prueba todas las muestras con EIA de anticuerpo anti-HBc: VIDAS HBcT I y II (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) e IMx Core™ revisión 2 (Abbott, Delkenheim, Alemania), y con otros EIA de anticuerpo anti-HBc incluyendo AxSYM Core y Corzyme (Abbott), ORTHO™ HBc ELISA (Ortho clinical diagnostics, Buckinghamshire, UK), Monolisa anti-HBc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y Elecsys anti-HBc (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania). Se determinaron otros marcadores serológicos específicos para VHB: HBsAg, anticuerpo anti-HBs, anticuerpo anti-HBc-IgM, HBeAg y anticuerpo anti-HBe utilizando respectivamente VIDAS HBsAg, VIDAS anti-HBs T, VIDAS HBc IgM, VIDAS HBc/anti-HBe (bioMérieux) y/o anticuerpo anti-HBe IMx (Abbott) y PCR de ADN de VHB (prueba Amplicor VHB Monitor™, Roche Diagnostic). IMx Core™ revisión 2, AxSYM Core y Elecsys anti-HBc se basan en un principio de prueba competitiva e incluyen un pretratamiento de muestras de suero con agentes reductores con el fin de minimizar reacciones falso positivo. El límite de detección de VIDAS HBc IgM es de 10 unidades PEI/ml (PEI, Paul Ehrlich Institute, Frankfurt, República Federal de Alemania). Todos los ensayos y la amplificación por PCR se realizaron e interpretaron según las instrucciones del fabricante.

El panel de sueros humanos incluía 22 sueros negativos y 20 sueros positivos. Los sueros negativos eran de pacientes vacunados o no vacunados. Se seleccionaron los sueros negativos de entre una gran población de donantes de sangre (de Etablissement Français du Sang, Francia), siendo los criterios que presentaran resultados discrepantes con los EIA comerciales específicos para anticuerpo anti-HBc realizados (véase la tabla 1) excepto por los n^{os}. 51 y 94. Entre ellos, 17 muestras dieron falso positivo o resultados dudosos sólo con EIA de anticuerpo anti-HBc que no incluyen pretratamiento de suero con agentes reductores (VIDAS HBcT I ó II, ORTHO™ HBc ELISA, Monolisa anti-HBc o Corzyme) pero dieron negativo con los ensayos que incluían un tratamiento de este tipo tal como IMx Core, AxSYM Core y Elecsys anti-HBc. Además, tras el pretratamiento de estos sueros con un agente reductor o la adición de anticuerpo anti-IgM, se volvieron negativos con los EIA del primer grupo (no mostrado) confirmando la presencia de reactividad de IgM no específica sensible reductora tal como se describió anteriormente (Robertson *et al.*, 1991). Las otras 3 muestras negativas dieron falso positivo con algunos EIA comerciales ya incluyeran o no pretratamiento con agente reductor.

que contenían concentraciones crecientes de G418 (0,25-4 mg/ml) con el fin de identificar aquéllas que portan copias múltiples del gen relevante. Se aislaron los clones resistentes a G418 His⁺ resultantes y se sembraron en placa de nuevo sobre agar de dextrosa mínimo, sin histidina y que contenía G418, para confirmar su fenotipo.

5 Se hicieron crecer transformantes resistentes a G418 His⁺ de *P. pastoris* en un matraz con agitador (250 rpm a 30°C) en 100 ml de un medio convencional rico [extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), base de nitrógeno de levadura al 1,34% (p/v), biotina 0,4 mg/l y fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0)] que contenía glicerol al 1% (p/v) (BMGY), hasta que la D₆₀₀ alcanzó 2-6. Para empezar la fase de inducción, se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendieron hasta un valor de D₆₀₀ de 1 en medio convencional rico que contenía un 0,5% de metanol (BMMY). Cada día posterior, se añadió el 100% de metanol hasta una concentración final del 1%. En el tercer día se recogieron las células de levadura. Se analizaron cultivos inducidos por metanol para la expresión de HBcAg utilizando el EIA descrito más adelante. Se seleccionó un transformante, aislado de la cepa original GS115 y que podía crecer con G418 1,75 mg/ml, por su alto nivel de expresión y se conservó para estudios de fermentación.

15 Se utilizaron las siguientes condiciones de fermentación: se mantuvo la concentración de oxígeno disuelto por encima del 20% de saturación utilizando aire enriquecido con oxígeno al 40% y una velocidad de agitación de hasta 1200 rpm; se mantuvo el pH a pH 5,0 a lo largo del procedimiento de fermentación [con hidróxido de amonio al 28% (v/v)] y se fijó la temperatura a 28°C. Se hizo crecer en matraz el transformante a 28°C hasta que la D₆₀₀ alcanzó 2-6 en un medio BMGY de cultivo de 100 ml. Se recogieron las células y se utilizaron para inocular un biorreactor de 2 litros (Biolaflite-Pierre Guerin S.A., Niort, Francia) que contenía 1 litro de BMGY. Tras extraer el glicerol del medio de cultivo, se fijó un suministro de glicerol al 50% (p/v) a 20 ml/h/l durante 2 h. El suministro de glicerol disminuyó entonces gradualmente cada hora hasta 10 ml/h/l, 7,5 ml/h/l, 5 ml/h/l, mientras se iniciaba un suministro de metanol (metanol al 100%) a una tasa de 2,7 g/h/l y luego se mantenía a 5,5 g/h/l en el medio de cultivo a lo largo de un periodo de 3 días. Para impedir la formación extensa de espuma, se añadió antiespumante 204 (Sigma). Se recogió el cultivo mediante centrifugación a 3000 g durante 10 min. a 4°C y se recuperó el sedimento celular y se almacenó a -80°C hasta su purificación.

1.4. Purificación de la yBW63 de HBcAg recombinante producida en *P. pastoris*.

30 Se prepararon extractos celulares agitando con vórtex sedimento de levadura resuspendido a 0,2 g/ml (biomasa de levadura húmeda) en tampón de ruptura [fosfato de sodio 50 mM, glicerol al 5% (p/v), PMSF 1 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4)] con perlas de vidrio de 425-600 µm lavadas con ácido en un batidor de perlas (PolyLabo, Estrasburgo, Francia) en cinco pulsos de 1 minuto. Tras la ruptura, se separó la suspensión celular de las perlas de vidrio y se centrifugó durante 20 min. a 10.000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante. Se filtró el HBcAg en el sobrenadante sobre una membrana de 0,22 µm y se trató mediante calentamiento a 65°C durante 60 min. tal como se describió previamente (Naito *et al.*, 1997). Se eliminaron proteínas turbias mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min. a 4°C y se recogió el sobrenadante como la fracción de HBcAg. Se concentró el producto purificado con calor sobre una membrana YM3 (punto de corte 3.000) en una célula AMICON (Millipore S.A., St-Quentin-Yvelines, Francia).

1.5. Gradiente de sacarosa.

45 Se pusieron en capas la yBW63 purificada con calor y la bOL32 purificada con quelatos metálicos en la parte superior de un gradiente de sacarosa formado en tubos de policarbonato [10 ml de sacarosa al 60% (p/v), 5 ml de sacarosa al 50% (p/v), 5 ml de sacarosa al 40% (p/v); 5 ml de sacarosa al 30% (p/v) y 5 ml de sacarosa al 20% (p/v) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,8)] y se centrifugaron en un rotor JA25.5 (Beckman Instruments, Gagny, Francia) a 75.600g durante 21 h a 4°C. Se fraccionaron los gradientes desde la parte superior y se detectaron las fracciones positivas para HBcAg mediante EIA tal como se describe más adelante en las fracciones de sacarosa al 50-60% (p/v) y se concentraron y dializaron frente a un tampón fosfato 10 mM (pH 7,8) en un concentrador Vivaspin (Sartorius S.A., Palaiseau, Francia) sobre una membrana de punto de corte de 30.000 Da. Se determinó la concentración de HBcAg midiendo la absorbancia a 280 y 320 nm y utilizando la fórmula: [1,55 (A₂₈₀-A₃₂₀) - 0,76 (A₂₆₀-A₃₂₀)] para tener en cuenta la presencia de ácidos nucleicos atrapados en las partículas centrales (Scheif y Wensink, 1981).

1.6. Análisis de SDS-PAGE y de inmunotransferencia de tipo Western.

55 Se resolvieron las muestras sobre Bis-Tris Novex Nu-PAGE™ al 4-12% en tampón de ejecución Nu-PAGE™ MES-SDS según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). O bien se tiñeron las proteínas con azul Coomassie Brilliant o bien se transfirieron electroforéticamente sobre una membrana de nitrocelulosa Protran (Schleicher & Schuell, Ecquevilly, Francia). Se bloquearon las membranas con BSA al 3% (p/v) en PBS y se incubaron con un suero positivo para anticuerpo anti-HBc humano (dilución 1:1000) en PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y BSA al 1% (p/v) (PBS/BSA/Tween). Se utilizó como anticuerpo secundario conjugado de peroxidasa del rábano-anticuerpo anti-IgG humana de cabra (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, EE.UU.) (dilución 1:5000) en PBS/BSA/Tween.

65

1.7. Detección de reactividad de HBcAg recombinante mediante EIA.

Se recubrió una placa de microtitulación con un anticuerpo anti-HBc monoclonal (P1D10, bioMérieux, 5 µg/ml, 100 µl/pocillo) durante 2 horas a 37°C, luego se saturó con leche al 1% (p/v) en PBS. Se incubó la muestra a una dilución 1:100 en PBS/Tween (100 µl/pocillo) durante una hora a 37°C. Después de tres lavados, se aplicó un suero positivo para anticuerpo anti-HBc humano (1:1500 en PBS/Tween) durante una hora. Después de tres lavados se incubó un conjugado marcado de peroxidasa del rábano-anticuerpo anti-IgG humana de cabra (Jackson) (1:15000 en PBS/Tween) durante 30 min. a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional, se añadieron 100 µl de reactivo de revelado del color de diclorhidrato de O-fenilendiamina (bioMérieux) a cada pocillo durante 10 min. a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 1,8 N y se leyó la absorbancia a 492 nm.

1.8. Secuenciación N-terminal.

Se resolvió HBcAg purificado mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, se transfirió a una membrana PVDF y se visualizó mediante tinción Ponceau S (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia). Se escindieron bandas de proteína y se sometieron a análisis de secuencia N-terminal de Edman en un secuenciador de proteínas (modelo 492, Applied Biosystems, les Ulis, Francia).

1.9. Digestión "en gel" enzimática de HBcAg y análisis de péptidos.

Se resolvió HBcAg purificado mediante SDS-PAGE y se digirió en gel la banda correspondiente a la forma de monómero. En resumen, se cargaron 30 µg de HBcAg reducido en carriles de gel. Se identificaron entonces las proteínas mediante tinción con azul Coomassie Brilliant, se escindieron, se destiñeron en acetonitrilo/carbonato de amonio 100 mM (pH 8,5) (50:50, v/v) y se secaron en un concentrador de vacío. Se redujeron las proteínas y se alquilaron mediante incubación en 100 µl de DTT 10 mM/carbonato de amonio 100 mM (pH 8,5). Tras una incubación de 30 min. a 37°C, se añadieron 100 µl de yodoacetamida 50 mM/carbonato de amonio 100 mM (pH 8,5) y se incubaron durante otros 30 min. Se lavaron entonces las bandas dos veces con 300 µl de tampón carbonato de amonio y una vez con 300 µl de acetonitrilo/tampón carbonato de amonio (50:50, v/v) antes del secado. Se realizó la digestión proteolítica incubando fragmentos de gel con 50 µl de tampón bicarbonato 25 mM, CaCl₂ 1 mM (pH 8,5) que contenía tripsina (enzima/sustrato, 1:50, p/p) durante 18 h a 37°C (Roche Diagnostics). Se agruparon posteriormente los sobrenadantes con los obtenidos tras dos extracciones adicionales con agua/acetonitrilo/ácido fórmico (50:50:5 en vol.).

Se concentraron las muestras y se dejaron caer sobre una placa de desorción/ionización con láser asistida por matriz-tiempo de vuelo y se sometieron a análisis de masa molecular en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Biflex III (Bruker, Wissembourg, Francia).

1.10. Análisis de fosforilación.

Se resolvieron bOL032 y yBW063 de HBcAg (10 µg) en Bis-Tris Novex Nu-PAGE™ al 4-12% tal como se describió anteriormente. Para detectar proteínas fosforiladas, se tiñó el gel con el kit de tinción de fosfoproteína Gelcode® (Perbio Science, Erembodegen-Aalst, Bélgica), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron respectivamente fosvitina (10 µg) e inhibidor de tripsina de soja (10 µg) como fosfoproteína de control positivo y negativo.

1.11. Titulación de grupos tiol libres en las proteínas purificadas.

Se determinó el contenido en grupos tiol libres de cada proteína recombinante utilizando reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) (Perbio Science). Se preparó una curva patrón con clorhidrato de cisteína monohidratado (Perbio Science) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron 50 µl de reactivo de Ellman 10 mM y 2,5 ml de un tampón fosfato 100 mM (pH 8,0) a 100 µl de patrón o proteína de muestra (2,5 mg de HBcAg). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 15 min., se leyó la absorbancia a 412 nm. Se calculó entonces la concentración de tiol utilizando la curva patrón.

1.12. Microscopía electrónica del HBcAg derivado de *E. coli* y *P. pastoris*.

Para preparar muestras para microscopía electrónica, se aplicaron las proteínas purificadas (5 µl de yBW63 a 0,5 mg/ml y 0,8 mg/ml de bOL32) a unas rejillas de cobre de malla 200 recubiertas con una película de colodión-carbono, se secaron al aire y luego se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 2%. Se examinaron las partículas utilizando un microscopio electrónico de transmisión Phillips CM120 con un voltaje de aceleración de 80 kV.

1.13. Detección de interacciones HBcAg-ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se añadió 1 µl de ARNasa A (2477 unidades u/ml, Sigma) o ADNasa (1 u/ml, Promega) a 10 µl de HBc purificada. Tras la incubación durante 30 min. a 22°C, se añadieron 2 µl de tampón de carga [NaPO₄ 50 mM, glicerina al 50% (v/v) y azul de bromofenol al 0,1% (p/v) (pH 7,4)] y se cargó la muestra en un gel de agarosa al 1% (p/v) que contenía bromuro de etidio (10 µg/ml). El tampón de gel y tampón de electroforesis era TAE 1X [Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (pH 8,3)]. Se visualizaron los nucleótidos mediante luz UV y se visualizaron las proteínas mediante tinción con azul Coomassie Brilliant.

1.14. Detección de anticuerpo anti-HBc mediante un EIA de tipo sándwich de cuatro etapas.

Se recubrieron micropartículas magnéticas (micropartículas M280 activadas con tosilo, Dynal, Oslo, Noruega) con HBcAg recombinante de *E. coli* o *P. pastoris* (6 µg de HBcAg por mg de micropartículas magnéticas) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incubaron posteriormente las perlas con una disolución de bloqueo [Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, BSA al 2% (p/v) (pH 7,5)] y se almacenaron hasta su utilización a 4°C, como una suspensión al 1% (p/v) en esta disolución de bloqueo.

Para el ensayo, se añadieron 20 µl de las perlas recubiertas con HBcAg (ya diluidas 1:20 en disolución de bloqueo) a 20 µl de suero humano (1:8 en disolución de bloqueo) y 160 µl de urea 3 M en disolución de bloqueo. Tras una incubación de 10 min. a 37 °C, se lavaron las perlas posteriormente cuatro veces con 500 µl de tampón A [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,2%, azida sódica al 0,9% (p/v) (pH 8)] y se incubaron durante 10 min. a 37°C con 100 µl de una disolución 1 ó 2 µg/ml de HBcAg recombinante biotinilado expresado a partir de *E. coli* o *P. pastoris* respectivamente. Tras cuatro lavados adicionales en tampón A, se incubaron las perlas con 100 µl de una disolución que contenía estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, durante 10 min. a 37°C. Tras tres lavados adicionales, se sometió a ensayo la actividad fosfatasa alcalina añadiendo sustrato Lumi-Phos[®] 530 (200 µl) (Lumigen, Inc., Southfield MI, USA) e incubación durante 10 min. a 37°C. Se midió la luminiscencia con un luminómetro Leader 450i (Gene-probe, San Diego, CA, USA).

Se expresaron en primer lugar los resultados como una razón entre la señal de la muestra y señal de referencia (s/r). El suero de referencia corresponde a 0,5 unidades PEI por ml. Se fijó el punto de corte de s/r óptimo a 3,0 para el ensayo realizado con yBW63 recombinante y 2,6 para el ensayo realizado con bOL32 según el mejor equilibrio de sensibilidad/especificidad. Se consideró una muestra como positiva si presentaba una s/r superior o igual al valor del punto de corte.

2. RESULTADOS

2.1. Expresión de HBcAg en *E. coli* y purificación.

La proteína bOL32, corresponde a los aminoácidos 1-185 de la secuencia de HBc subtipo adw2, ya descrita por Valenzuela *et al.*, 1980, seguido por seis residuos de histidina en el extremo C-terminal y cuatro residuos de aminoácido adicionales en el extremo N-terminal debido a la estrategia de clonación (figura 1). Se expresó BOL32 en *E. coli* y se purificó en condiciones desnaturalizantes utilizando el procedimiento de cromatografía con quelatos metálicos descrito en la sección de Materiales y métodos.

En experimentos preliminares, el HBcAg expresado en *E. coli* no pudo unirse la columna de quelatos metálicos en condiciones nativas. La proteína debía desnaturalizarse utilizando urea 8 M y β-mercaptoetanol para permitir la unión a la columna, lo que sugiere que, en condiciones nativas, la etiqueta de hexahistidina ubicada en el extremo C-terminal no era accesible. Con el fin de aumentar el rendimiento de la renaturalización/reoxidación de la proteína, se sometió la proteína purificada con quelatos metálicos a diálisis frente a un tampón de plegado que contenía una concentración no desnaturalizante de urea y glutatión reducido/oxidado como sistema de "intercambio de óxidos" y finalmente se almacenó en un tampón libre de urea que contenía glicerol (véase la sección de Materiales y métodos). Se requirió la adición de glicerol en el tampón de almacenamiento como aditivo estabilizante para evitar la precipitación de la proteína recombinante. Se obtuvo esta proteína presumiblemente "renaturalizada" con un rendimiento de 25 mg de HBcAg por litro de cultivo de *E. coli* inicial y se purificó adicionalmente mediante sedimentación sobre un gradiente de sacarosa tal como se describió en la sección de Materiales y métodos. El rendimiento final tras esta segunda purificación fue de aproximadamente 2,5 mg/l de cultivo de *E. coli* inicial.

2.2. Expresión de HBcAg en *P. pastoris* y purificación.

La proteína yBW63, correspondiente a la secuencia de HBc completa (figura 1), se expresó en *P. pastoris* utilizando el vector de expresión pPIC3.5K de modo que la expresión del gen estuviera bajo el control del promotor de alcohol oxidasa (AOX1) inducible por metanol. Se purificó la yBW63 de HBcAg mediante tratamiento térmico seguido por un gradiente de sacarosa tal como se describió en la sección de Materiales y métodos. El rendimiento final tras esta purificación de dos etapas fue de aproximadamente 50 mg/l de cultivo de *P. pastoris* inicial.

2.3. Caracterización de HBcAg recombinante a partir de *E. coli* y *P. pastoris*.

Se analizaron las dos bOL32 y yBW63 de HBcAg recombinantes purificadas mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western con suero humano específico de anticuerpo anti-HBc. La figura 2A-B, carriles 1-2 mostraron que en condiciones reductoras, ambas proteínas migraban como banda principal con una masa molecular aparente de 20-22 kDa próxima a la masa molecular teórica de 21395 y 22650 Da esperada respectivamente para la proteína monomérica yBW63 y bOLB32. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western también indicaba la presencia de HBcAg con una masa molecular aparente de 40-44 kDa que debería corresponder a moléculas de dímero no sensibles reductoras (figura 2B, carriles 1, 2). De hecho, se ha mostrado que las moléculas de HBc se asocian para dar dímeros y que un puente disulfuro estabiliza la forma dimérica pero no se requiere para su formación (Zhou y Standring, 1992). Se observó en gel teñido con azul Coomassie Brilliant una banda tenue por encima del tamaño esperado para el monómero de bOL32 de HBc en condiciones reductoras (figura 2A, carril 2) y una banda tenue por debajo del tamaño del monómero. La banda de peso molecular inferior (16 kDa) era ligeramente reactiva con el anticuerpo anti-HBc policlonal humano y corresponde probablemente a una proteólisis limitada del dominio C-terminal de bOL32, mientras que la banda de peso molecular superior no era reactiva lo que sugiere que es una proteína contaminante (figura 2). Como resultado, se observó también heterogeneidad de masa molecular que corresponde a moléculas de bOL32 diméricas (p22-p22; p22-p16; p16-p16) (figura 2B, carril 2).

En condiciones no reductoras, ambas proteínas recombinantes yBW63 y bOL32 no entraban en el gel o migraban en una banda muy ancha con una masa molecular aparente de 40 kDa y superior, consistente con la presencia de dímeros estabilizados mediante enlaces disulfuro intercadena y multímeros superiores. Estos resultados están de acuerdo con informes anteriores, mostrando que la mayoría de polipéptidos de HBcAg se autoensamblan para dar partículas similares a cápside compuestas por moléculas de dímero estabilizadas mediante enlaces disulfuro intermoleculares (Zheng *et al.*, 1992).

A partir de muestras de HBcAg expresado en *E. coli* recién preparadas, directamente tras cromatografía de quelatos metálicos, se observaron formas predominantemente monoméricas con SDS-PAGE no reductora. La proporción de dímeros y multímeros superiores aumentó con el tiempo de almacenamiento (no mostrado) lo que sugiere un aumento dependiente del tiempo de moléculas unidas a disulfuro intermolecular. Para limitar las variaciones entre lotes, se introdujo una diálisis en un tampón de "intercambio de óxidos" en el protocolo de purificación de HBc expresada en *E. coli* para favorecer el plegado y el autoensamblaje de moléculas de HBc para dar partículas similares a cápside antes del almacenamiento (véase la sección de Materiales y métodos).

2.4. Modificación N-terminal, de masa molecular, co- o postraduccional.

Se aislaron las dos proteínas recombinantes monoméricas de SDS-PAGE y se sometieron a secuenciación de aminoácidos N-terminales. El análisis de secuenciación de Edman indicaba que los primeros cinco aminoácidos de bOL32 eran Met-Arg-Gly-Ser-Met lo que corresponde a la secuencia N-terminal esperada (figura 1). No pudo determinarse la secuencia N-terminal de yBW63 utilizando el mismo procedimiento lo que sugiere un extremo N-terminal bloqueado o modificación N-terminal.

Con el fin de confirmar la secuencia de las dos proteínas recombinantes se utilizó degradación proteolítica con tripsina seguido por análisis de MALDI-TOF-MS. Se llevó a cabo digestión en gel con tripsina de las proteínas recombinantes reducidas y alquiladas (cisteína carboxiamidometilada). Se detectaron los péptidos resultantes mediante MALDI-TOF-MS. Todos los péptidos relacionados con la proteína bOL32 coincidían con la masa molecular teórica de las secuencias esperadas lo que permite la verificación de los primeros 153 residuos de aminoácido de bOL32. Sin embargo, no pudo verificarse la secuencia 150-185 rica en arginina C-terminal. De hecho, las masas de los fragmentos inducidos por digestión de tripsina estaban por debajo del intervalo de nuestra MALDI-TOF-MS (500 amu). El análisis de los fragmentos de yBW63 derivados de tripsina de manera proteolítica permite la verificación de la secuencia de aminoácidos 8-149. En cuanto a la proteína bOL32, no pudo identificarse la secuencia 150-185 rica en arginina C-terminal. Además no se encontró el péptido N-terminal con o sin la primera metionina (aa 1-7 ó 2-7 con masa teórica respectiva de 881,4 ó 750,4) pero se detectó un péptido de masa 923,4 que debería corresponder al aa 1-7 N-acetilado de péptido. La conservación de la primera metionina está de acuerdo con la bibliografía que muestra que la metionina aminopeptidasa no actúa sobre proteínas con penúltimos residuos grandes tales como ácido aspártico (Polevoda y Sherman, 2000). Por otro lado, la acetilación se describe como una de las modificaciones más comunes que se producen en la gran mayoría de proteínas eucariotas pero rara vez en proteínas procariontas. La N-acetilación de la proteína yBW63 no es sorprendente ya que todas las proteínas eucariotas que empiezan con Met-Asp (como yBW63) o Met-Glu descubiertas en búsquedas de bibliografía y bases de datos estaban acetiladas de manera N-terminal (Polevoda y Sherman, 2000).

No se detectó ninguna otra modificación co- o postraduccional en las proteínas recombinantes. Utilizando un procedimiento de tinción específico de proteínas fosforiladas directamente sobre SDS-PAGE (descrito en la sección de Materiales y métodos), no se mostró ninguna fosforilación de las proteínas recombinantes bOL32 y yBW63 (no mostrado). Estos resultados confirmaron los obtenidos por Machida *et al.* (1991) que muestran que las proteínas de HBcAg expresadas en *E. coli* y levadura no estaban fosforiladas, mientras que se encontraron proteínas centrales

aisladas de tejidos humanos así como HBcAg recombinante expresado en células de mamífero o de insecto fosforiladas en residuos de serina en el dominio C-terminal (Lanford y Notvall, 1990; Liao y Ou, 1995). Por otro lado, se utilizó dicroísmo circular para examinar las estructuras secundarias globales de las dos cápsides de HBcAg recombinantes y ambas partículas mostraron espectros idénticos (no mostrado).

2.5. Grupos tiol libres en las proteínas de HBcAg recombinantes.

Con el fin de aclarar la posible similitud o diferencia entre bOL32 y yBW63 de HBcAg, se evaluó la presencia de grupos tiol libres en estas proteínas recombinantes purificadas mediante reacción con el reactivo de Ellman. En condiciones nativas, se encontraron respectivamente 0,372 y 0,235 grupos sulfhidrilo medibles por proteína bOL32 y yBW63 de HBcAg monomérica.

2.6. Microscopía electrónica de las partículas de yBW63 y bOL32.

Mediante microscopía electrónica, las partículas de bOL32 mostraron una forma de partícula similar a nativa esférica con un promedio de 34 ± 2 nm de diámetro y las partículas de yBW63 28 ± 2 nm ($n = 15$ partículas) (véase la figura 3).

2.7. Interacciones núcleo-ácidos nucleicos.

La electroforesis de los dos HBcAg recombinantes sobre gel de agarosa teñido con bromuro de etidio seguido por tinción con azul Coomassie Brilliant mostró que las partículas de HBcAg, purificadas o bien de *P. pastoris* o bien de *E. coli*, contenían componentes de ácido nucleico (figura 4AB, carriles 1). Las partículas de yBW63 migraron como banda individual sobre gel de agarosa mientras que la preparación de partículas de bOL32 migró como una banda principal para la que la migración era ligeramente más corta que la migración de yBW63 y dos bandas menores (figura 4B). Estas discrepancias sugerían diferencias en la carga o el tamaño entre las dos preparaciones consistentes con el análisis de microscopía electrónica. Tras la digestión con ADNasa, los ácidos nucleicos atrapados en las partículas de yBW63 o bOL32 no se vieron afectados (figura 4AB, comparar carriles 1 y 4). Tras la digestión con ARNasa, los componentes de ácido nucleico permanecieron asociados con yBW63, lo que indica la presencia de ADN protegido contra ADNasa o ARN protegido contra ARNasa en las cápsides de yBW63. Sin embargo, la asociación de ácidos nucleicos con bOL32 desapareció tras el tratamiento con ARNasa. Además, el gel de agarosa teñido con azul Coomassie Brilliant indicaba que la degradación de ARN asociado con HBc inducía una fuerte modificación en la migración de las proteínas bOL32 sobre gel de agarosa, lo que sugiere modificaciones estructurales de las partículas de HBc (figura 4B) tras la liberación de ARN. La presencia de ARN y nada de ADN en las partículas de HBcAg está de acuerdo con resultados anteriores (Birnbbaum y Nassal, 1990; Zheng *et al.*, 1992).

2.8. Detección de reactividad de anticuerpo anti-HBc en suero humano.

Se preparó un EIA de formato tipo sándwich para la detección de reactividad de anticuerpo anti-HBc en sueros humanos. En primer lugar, se recubrió el HBcAg recombinante purificado, bOL32 o yBW63, sobre micropartículas magnéticas tal como se describió en Materiales y métodos, luego se incubaron las perlas recubiertas con HBcAg con suero humano (dilución final 1:80 en presencia de urea 2,4 M). Tras el lavado, se reveló la presencia de anticuerpo anti-HBc utilizando HBcAg recombinante marcado con biotina, homólogo al HBcAg utilizado en la fase sólida, seguido por un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Se sometió a prueba la reactividad de HBcAg recombinante contra sueros humanos incluyendo un panel de 22 sueros negativos (tabla I) y un panel de 20 sueros positivos (tabla II) bien caracterizados por su reactividad de anticuerpo anti-HBc con EIA comerciales específicos.

Con la proteína recombinante yBW63, se detectó anticuerpo anti-HBc en todos los especímenes positivos mientras que con la proteína bOL32 no se detectó un suero positivo débil (n° 63) (tabla II). Entre los especímenes negativos, seleccionados debido a que dieron resultados falso positivo con algunos EIA comerciales, se confirmó que todos eran negativos con el EIA de tipo sándwich realizado con yBW63, incluyendo las 17 muestras que contenían IgM no específica sensible reductora (tabla I). Sin embargo, para las muestras 86 y 87, que se encontró que eran falso positivo con VIDAS HBcT I, también se encontró que eran falso positivo con bOL32. Entre las tres muestras clasificadas como positivas para anticuerpo anti-HBc, las muestras 43 y 46, positivas con los EIA comerciales realizados, se confirmaron como positivas con el EIA de tipo sándwich realizado con ambas proteínas recombinantes. La muestra 98, para la que se encontró que era positiva para anticuerpo anti-HBc con VIDAS HBcT I y negativa con los EIA de anticuerpo anti-HBc actuales también se encontró que era positiva para anticuerpo anti-HBc IgM (25 PEI unidad/ml) mediante el VIDAS HBcM y positiva en el ensayo de tipo sándwich realizado con ambas proteínas recombinantes. Aunque la importancia clínica de detectar anticuerpo anti-HBc en ausencia de otros marcadores de VHB es incierta (Luo *et al.*, 1991), esta muestra es probablemente falso negativa con la mayoría de ensayos comerciales actuales pero se aisló e identificó como de anticuerpo anti-HBc mediante nuestro ensayo de tipo sándwich.

Por tanto, el EIA de tipo sándwich realizado con la proteína bOL32 parecía sufrir una sensibilidad y especificidad inferiores que el ensayo realizado con la proteína yBW63 ya que se obtuvieron un resultado falso negativo y dos resultados falso positivo utilizando la proteína bOL32.

5 TABLA I: Panel negativo, resultados obtenidos con el EIA de tipo sándwich de anticuerpo anti-HBc realizado con yBW63 y bOL32 de HBcAg recombinantes.

Suero n.º	Resultados de anticuerpo anti-HBc			
	EIA comerciales ^a		EIA de tipo sándwich con	
	a	b	YBW63	bOL32
51, 94	-	-	-	-
39, 40, 41, 71, 76, 77, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 88, 89, 99	3-	-, D o +	-	-
86, 87	3-	1-, 1+	-	+
50	3+	2-, 1D, 1+	-	-
70	1-, 2+	3-, 1+	-	-
82	1-, 1D, 1+	1-, 3D	-	-

Resultados indicados como + positivo, - negativo o D, dudoso en base al punto de corte para cada ensayo.

10 a, EIA comercial de entre IMx Core™, AxSYM Core y Elecsys anti-HBc, es decir incluyendo pretratamiento de suero con DTT.

b, EIA comercial de entre VIDAS HBcT I ó II y ORTHO™ HBc, Monolisa anti-HBc y Corzyme.

15 ^a Cuando se observaron discrepancias referentes a los resultados de anticuerpo anti-HBc, se especificó el número de resultados positivos o negativos obtenidos con los diferentes EIA comerciales de anticuerpo anti-HBc realizados.

TABLA II: Panel positivo, comparación de marcadores serológicos de VHB y resultados obtenidos con el EIA de tipo sándwich de anticuerpo anti-HBc realizado con yBW63 y bOL32 de HBcAg recombinantes.

Estado	suero n.º	Resultados de anticuerpo anti-HBc				Otros marcadores serológicos específicos de VHB		
		EIA comerciales ^a		EIA de tipo sándwich con		HBcAg	anticuerpo anti-HBs	anticuerpo anti-HBe
		a	b	yBW63	bOL32			
Positivo recuperado	5, 12, 19, 23, 24, 26, 90	+	+	+	+	-	+	+
	45	+	+	+	+	-	+	-
	63	3+	3+	+	-	-	+	+
Positivo crónico	52	+	+	+	+	+	-	+
	54	+	+	+	+	+	+	+
	56, 59, 62, 65, 68, 97	+	+	+	+	+	-	-
HBc aislado	43, 46	+	+	+	+	-	-	-
	98	3-	1+, 1-	+	+	-	-	-

20 Resultados indicados como + positivo o - negativo en base al punto de corte para cada ensayo.

a, EIA comercial realizado de entre IMx Core™, AxSYM Core y Elecsys anti-HBc, es decir incluyendo pretratamiento de suero con DTT.

b, EIA comercial realizado de entre VIDAS HBcT I y II, ORTHO™ HBc ELISA, Monolisa anti-HBc y Corzyme.

25 ^a Cuando se observaron discrepancias referentes al resultado de anticuerpo anti-HBc, se especificó el número de resultados positivos o negativos obtenidos con los diferentes ensayos comerciales de anticuerpo anti-HBc realizados.

30 Para evaluar adicionalmente la especificidad del inmunoensayo de tipo sándwich desarrollado, se sometió a prueba una población de 184 muestras de suero de individuos sanos (donantes de sangre) con la proteína recombinante yBW63 (véase la tabla III). Con un ajuste de punto de corte a $s/r=3$, se identificaron los 184 especímenes como negativos, siendo sus valores de s/r mucho menores que el punto de corte (tabla III). Estos resultados asumían una especificidad del 100% para el EIA de tipo sándwich realizado con la proteína yBW63.

TABLA III: Reactividad de anticuerpo anti-HBc en sueros de donantes de sangre (n = 184) utilizando yBW63 de HBcAg de *P. pastoris* en un EIA de tipo sándwich.

Suero	Razón de muestra con respecto a referencia ^a
N = 180	0,08-0,68 valor medio: 0,19
n = 4	0,75-1,07
negativo conocido n.º 51	0,17 ± 0,08 ^b
positivo conocido n.º 45	20,15 ± 4,45 ^b

5 ^apunto de corte = 3
 ^bmedia de 15 pruebas

3. DISCUSIÓN

10 Se ha mostrado previamente que los 40 residuos C-terminales básicos de HBcAg recombinante no se requieren para el ensamblaje de la cápside (Milich *et al.*, 1988; Gallina *et al.*, 1989) pero potencian la estabilidad de la cápside. Varios grupos han descrito que la fusión de secuencias heterólogas al extremo C-terminal permite en algunos casos la detección de las secuencias heterólogas con anticuerpos específicos indicando la localización externa de los epítopos foráneos (Borisova *et al.*, 1989; von Brunn *et al.*, 1993; Yoshikawa *et al.*, 1993). Puesto que las cápsides de HBc contienen orificios sobre sus superficies particuladas (Böttcher *et al.*, 1997; Conway *et al.*, 1997), se especuló que las cadenas de polipéptido foráneo salían a través de los orificios pasando a estar ubicadas por tanto sobre la superficie y siendo accesibles a los anticuerpos. Por tanto, se creyó que una etiqueta de hexahistidina C-terminal sería menos vulnerable a la estructura de HBcAg y estaría más expuesta sobre la superficie de partícula que una extensión N-terminal descrita previamente como que es inaccesible a la superficie (Karpenko *et al.*, 1997). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la etiqueta de hexahistidina C-terminal no podía alcanzarse para fines de purificación en la superficie de las partículas desnaturalizadas y estaba ubicada probablemente dentro de la cubierta de cápside tal como sugirieron Wingfield *et al.* (1995) o alternativamente no era accesible en estructuras plegadas erróneamente expresadas en *E. coli*.

25 Zheng *et al.* (1992) han mostrado que la formación del enlace disulfuro no es esencial para el ensamblaje de la cápside de HBcAg. Es un procedimiento de maduración; la proteína inicialmente ensamblada en el entorno reductor del citoplasma de *E. coli* probablemente está completamente reducida, pero durante el aislamiento y almacenamiento, se produce la oxidación, lo que implica especialmente cisteínas C-terminales altamente reactivas. Nuestros resultados obtenidos con la HBc expresada en *E. coli* están principalmente de acuerdo con estas observaciones mostrando que la HBc purificada en condiciones desnaturalizantes y reductoras podría reformar las nucleocápsides aprovechando las propiedades de autoensamblaje de HBcAg.

35 El HBcAg presenta cuatro residuos de cisteína, por tanto es posible un gran número de posibles patrones de unión de disulfuro. No existen enlaces disulfuro intracadena pero pueden producirse dos o tres enlaces disulfuro intercadena (Zheng *et al.*, 1992). El residuo Cys183 está siempre implicado en un enlace disulfuro con otro Cys183, dando como resultado la formación de un dímero. Estos pares de dímeros están unidos mediante puentes disulfuro intermoleculares homólogos entre dos residuos Cys61 (Zheng *et al.*, 1992). Cys107 existe como un sulfhidrilo libre oculto dentro de la estructura de la partícula y no es reactivo en condiciones no desnaturalizantes mientras que Cys48 puede participar en unión de disulfuro entre los mismos monómeros que los unidos por Cys61 y existe tanto como disulfuro como como sulfhidrilo libre en aproximadamente cantidades iguales (Zheng *et al.*, 1992). La proporción de grupos sulfhidrilo libres que se midieron por monómero de bOL32 y yBW63 de HBcAg (0,372 y 0,235 respectivamente) fue inferior a la encontrada por Zheng *et al.* (1992). Además, se observó que los ácidos nucleicos atrapados con las partículas de yBW63 estaban mejor protegidos que los asociados con partículas de bOL32. Estos resultados sugieren que la unión de disulfuro aditiva en yBW63, que implica probablemente Cys48s, podría contribuir a una estabilización adicional de las partículas de HBcAg y explicar la estabilidad superior de las partículas de yBW63 que se observaron en comparación con la bOL32. Alternativamente, la hexahistidina C-terminal y/o la extensión N-terminal de bOL32 podría implicar un aumento del tamaño de los orificios que penetran en la cubierta de proteína de partícula ensamblada (Crowther *et al.*, 1994) permitiendo la accesibilidad de ARNasa a ARN asociado con HBc.

50 Se han notificado que las partículas centrales del virus de la hepatitis B nativas de hígado humano visualizadas mediante tinción negativa presentan diámetros de 27-30 nm y un aspecto icosaédrico (Onodera *et al.*, 1982). También se han notificado dimensiones y morfologías similares para cápsides recombinantes producidas en *E. coli* (Winfield *et al.*, 1995) o células eucariotas (Yamaguchi *et al.*, 1988; Zhou y Strandring, 1991) y se han confirmado mediante microscopía electrónica (Crowther *et al.*, 1994). La observación de las partículas de yBW63 expresadas en *P. pastoris* están de acuerdo con un diámetro de 28 ± 2 nm mientras que las partículas de bOL32 parecían ligeramente más grandes con un diámetro de 34 ± 2 nm. Esta diferencia podría estar provocada por las

modificaciones de secuencia introducidas en el constructo de bOL32 (4 aminoácidos añadidos de manera N-terminal y 6 histidinas en de manera C-terminal).

Las discrepancias globales observadas entre las bOL32 y yBW63 de HBcAg (diferencia en accesibilidad de ARNasa, cantidad de grupos sulfhidrilo libres, tamaño de partícula) se asociaron con diferencias en los rendimientos de estas proteínas como componente principal en el EIA de tipo sándwich desarrollado. La proteína bOL32 de *E. coli*, en comparación con la proteína yBW63 de levadura, proporcionó sensibilidad y especificidad inferiores. Esto podría deberse a un plegado *in vitro* incompleto de bOL32 tras su procedimiento de purificación desnaturalizante, lo que se sugiere por la proporción superior de grupos tiol libres encontrados para bOL32 en comparación con yBW63. Además, la presencia de proteína contaminante de *E. coli* restante en la preparación de bOL32 tal como se evalúa mediante la figura 2 podía explicar la especificidad inferior de bOL32.

Sin embargo, el HBcAg expresado en *P. pastoris* permitía la producción con un rendimiento alto (50 mg/l de cultivo de *P. pastoris* inicial) de HBcAg recombinante de alta calidad permitiendo el desarrollo de un EIA de tipo sándwich de anticuerpo anti-HBc que, a diferencia del EIA competitivo, evita la utilización de anticuerpo anti-HBc. Los resultados preliminares indican que este ensayo podía reducir la frecuencia de resultados falso positivo que resultan de sustancias de interferencia en sueros humanos observada con algunos EIA comerciales (véase la tabla I). El ensayo de tipo sándwich también podía evitar resultados falso negativo que podían explicarse por la presencia de anticuerpos contra epítopos no inmunodominantes (véase la tabla II). De hecho, los ensayos de formato de competencia o de inhibición actuales se basan en la observación con respecto a la presencia de un epítipo inmunodominante en HBcAg. Sin embargo, se han descrito otros epítopos menores (Salfeld *et al.*, 1989; Pujol *et al.*, 1994; Pusko *et al.*, 1994). Por tanto, se podía especular que la utilización en el ensayo de inhibición actual de anticuerpo anti-HBc dirigido contra el epítipo inmunodominante puede mediar en algunos casos sólo una inhibición parcial de la unión de suero humano que contiene anticuerpos contra epítipo no inmunodominante en un EIA competitivo e implica por tanto un resultado falso negativo.

Bibliografía

Arakawa *et al.*, 1966, J. Biochem 120: 657-662.

Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423-426.

Birnbaum, F. y Nassal, M. 1990. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. J. Virol. 64:3319-3330.

Blazar *et al.*, 1997, Journal of Immunology 159: 5821-5833 y Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423-426.

Borisova, G. P., Berzins, I., Pushko, P. M., Pumpen, P., Gren, E. J., Tsinbinogin, V. V., Loseva, V., Ose, V., Ulrich, R., Siakkou, H. y Rosenthal H. A., 1989. Recombinant core particles of hepatitis B virus exposing foreign antigenic determinants on their surface. FEBS Lett. 259, 121-124.

Böttcher, B., Wynne, S. A. y Crowther, R. A., 1997. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. Nature 386, 88-91.

Chaudray *et al.*, 1989, Nature 339: 394-397.

Cheyne, V., Verrier, B. y Mallet, F., 1993. Overexpression of HIV-1 proteins in *Escherichia coli* by a modified expression vector and their one-step purification. Prot. Expr. Purif. 4, 367-372.

Cohen, B. J. y Richmond, J. E., 1982. Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. Nature 296, 677-678.

Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P. T., Stahl, S. J. y Steven, A. C., 1997. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. Nature 386, 91-94.

Crowther, R. A., Kiselev, N. A., Böttcher, B., Berriman, J. A., Borisova, G. P., Ose, V. y Pumpens, P., 1994. Three-Dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. Cell 77, 943-950.

Dodd, R. Y. y Popovsky, M. A., 1991. Antibodies to hepatitis B core antigen and the infectivity of the blood supply. Scientific Section Coordinating Committee [la fe de erratas publicada aparece en Transfusion septiembre de 1991; 31 (7):594]. Transfusion 31, 443-449.

Galfre G. *et al.*, 1977 Nature, 266: 522-550.

- Gallina, A., Bonelli, F., Zentilin, L., Rindi, G., Muttini, M. y Milanese, G., 1989. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.* 63, 4645-4652.
- 5 Karpenko, L. I., Ryazankin, I. A., Chikaev, N. A., Kolesnikova, L. V. y Hyichev, A. A., 1997. Localization of the amino terminus of the hepatitis B virus core antigen within the core particle. *Virus Res.* 52, 15-23.
- Kenney, J. M., von Bonsdorff, C. H., Nassal, M. y Fuller, S. D., 1995. Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure* 3, 1009-1019.
- 10 Köhler G. y Milstein C., 1975: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256: 495-497.
- Lanford, R. E. y Notvall, L., 1990. Expression of Hepatitis B Virus Core and Precore Antigens in Insects Cells and Characterization of a Core-Associated Kinase Activity. *Virology* 176, 222-233.
- 15 Liao, W. y Ou, J. H., 1995. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J. Virol.* 69, 1025-1029.
- 20 Luo, K. X., Zhou, R., He, C., Liang, Z. S., y Jiang, S. B., 1991. Hepatitis B virus DNA in sera of virus carriers positive exclusively for antibodies to the hepatitis B core antigen. *J. Med. Virol.* 35, 55-59.
- Machida, A., Ohnuma, H., Tsuda, F., Yoshizawa, H., Hoshi, Y., Tanaka, T., Kishimoto, S., Akahane, Y., Miyakawa, Y. y Mayumi, M., 1991. Phosphorylation in the carboxy-terminal domain of the capsid peroteín of hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody. *J. Virol.* 65, 6024-6030.
- 25 Milich, D. R., Chen, M., Schodel, F., Peterson, D. L., Jones, J. E. y Hughes, J. L., 1997a. Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 94, 14648-14653.
- 30 Milich, D. R., McLachlan, A., Stahl, S., Wingfield, P., Thornton, G. B., Hughes, J. L. y Jones, J. E., 1988. Comparative immunogenicity of hepatitis B virus core and E antigens. *J. Immunol.* 141, 3617-3624.
- Milich, D. R., Schodel, F., Hughes, J. L., Jones, J. E. y Peterson, D. L., 1997b. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol.* 71, 2192-2201.
- 35 Naito, M., Ishii, K., Nakamura, Y., Kobayashi, M., Takada, S. y Koike, K., 1997. Simple method for efficient production of hepatitis B virus core antigen in *Escherichia coli*. *Res. Virol.* 148, 299-305.
- Nassal, M. y Schaller, H., 1993. Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol.* 1, 221-228.
- 40 Onodera, S., Otori, H., Yamaki, M. y Ishida, N., 1982. Electron microscopy of human hepatitis B virus cores by negative staining-carbon film technique. *J. Med. Virol.* 10, 147-155.
- Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., Leadbetter, G. y Murray, K., 1979. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 282, 575-579.
- 45 Polevoda, B. y Sherman, F., 2000. Nalpha -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 36479-36482.
- 50 Pujol, F. H., Bertolotti, A., Fields, H. A., Khudyakov, Y. E., Kalinina, T. I. y Liprandi, F., 1994. A monoclonal inhibition enzyme immunoassay for detection of antibodies against hepatitis B core antigen: confirmation of an immunodominant epitope. *J. Immunoassay* 15, 239-249.
- 55 Pushko, P., Sallberg, M., Borisova, G., Ruden, U., Bichko, V., Wahren, B., Pumpens, P. y Magnus, L., 1994. Identification of hepatitis B virus core protein regions exposed or internalized at the surface of HBcAg particles by scanning with monoclonal antibodies. *Virology* 202, 912-920.
- Robertson, E. F., Weare, J. A., Randell, R., Holland, P. V., Madsen, G. y Decker, R. H., 1991. Characterization of a reduction-sensitive factor from human plasma responsible for apparent false activity in competitive assays for antibody to hepatitis B core antigen. *J. Clin. Microbiol.* 29, 605-610.
- 60 Roda A., Bolelli G.F.: Production of high-titre antibody to bile acids, *Journal of Steroid Biochemistry*, vol. 13, págs. 449-454 (1980).
- 65 Salfeld, J., Pfaff, E., Noah, M. y Schaller, H., 1989. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J. Virol.* 63, 798-808.

- Schleif, R. F. y Wensink, P. C., 1981. *Practicals Methods in Molecular Biology*. Nueva York, Springer-Verlag, pág. 74.
- 5 Spronk, A. M., Schmidt, L., Krenc, C., Pavlis-Jenkins, L., Brady, J., Taskar, S., Angus-Finn, L. y Mimms, L., 1991. Improvements in detection of antibody to hepatitis B core antigen by treating specimens with reducing agent in an automated microparticle enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 29,611-616.
- 10 Valenzuela, P., Quiroga, M., Zalvidar, J., Gray, P. y Rutter, W.J. 1980. The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes *Animal Virus Genetics*, 57-70, Fields, B.N., Jaenisch, R. y Fox, C.F. (Eds.). Academic Press, Nueva York
- 15 von Brunn, A., Brand, M., Reichhuber, C., Morys-Wortmann, C., Deinhardt, F. y Schodel, F., 1993.: Principal neutralizing domain of HIV-1 is highly immunogenic when expressed on the surface of hepatitis B core particles. *Vaccine* 11, 817-824.
- Weare, J. A., Robertson, E. F., Madsen, G., Hu, R. y Decker, R. H., 1991. Improvement in the specificity of assays for detection of antibody to hepatitis B core antigen. *J. Clin. Microbiol.* 29, 600-604.
- 20 Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Williams, R. W. y Steven, A. C., 1995.: Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: Subunit composition, conformational analysis, and *in vitro* capsid assembly. *Biochemistry* 34, 4919-4932.
- Wizemann, H. y von Brunn, A., 1999. Purification of E. coli-expressed HIS-tagged hepatitis B core antigen by Ni²⁺ - chelate affinity chromatography. *J. Virol. Methods* 77, 189-197.
- 25 Wynne, S. A., Crowther, R. A. y Leslie, A. G., 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* 3, 771-780.
- 30 Yamaguchi, M., Hirano, T., Sugahara, K., Mizokami, H., Araki, M. y Matsubara, K., 1988. Electron microscopy of hepatitis B virus core antigen expressing yeast cells by freeze-substitution fixation. *Eur. J. Cell Biol.* 47, 138-143.
- Yoshikawa, A., Tanaka, T., Hoshi, Y., Kato, N., Tachibana, K., Iizuka, H., Machida, A., Okamoto, H., Yamasaki, M., Miyakawa, Y., y ., 1993. Chimeric hepatitis B virus core particles with parts or copies of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 67, 6064-6070.
- 35 Zheng, J., Schodel, F. y Peterson, D. L., 1992. The structure of hepadnaviral core antigens. Identification of free thiols and determination of the disulfide bonding pattern. *J. Biol. Chem.* 267, 9422-9429.
- 40 Zhou, S. y Standing, D. N., 1992. Cys residues of the hepatitis B virus capsid protein are not essential for the assembly of viral core particles but can influence their stability. *J. Virol.* 66, 5393-5398.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la detección de anticuerpos anti-HBc en una muestra biológica que va a someterse a prueba, tal como sangre, plasma o suero, de un individuo o de un animal que es probable que esté infectado o que haya sido infectado por VHB, según el cual se llevan a cabo por lo menos las siguientes etapas:

- se prepara una mezcla, que comprende:

10 i) una proteína de HBcAg recombinante altamente purificada, produciéndose la proteína mediante la expresión de células de levadura de *Pichia*, mediante la utilización de un sistema o casete de expresión que permite la expresión de ADN de HBc o fragmentos del mismo que codifican para HBcAg, puesto bajo el control de elementos necesarios para su expresión,

15 en el que dicha proteína de HBcAg recombinante está inmovilizada sobre un soporte sólido,

(ii) la muestra que va a someterse a prueba que comprende, si están presentes, anticuerpos anti-HBc,

20 (iii) un ligando marcado que podrá reaccionar con los anticuerpos anti-HBc de muestra; siendo el ligando marcado dicha proteína de HBcAg recombinante marcada producida mediante la expresión en células de levadura de *Pichia*

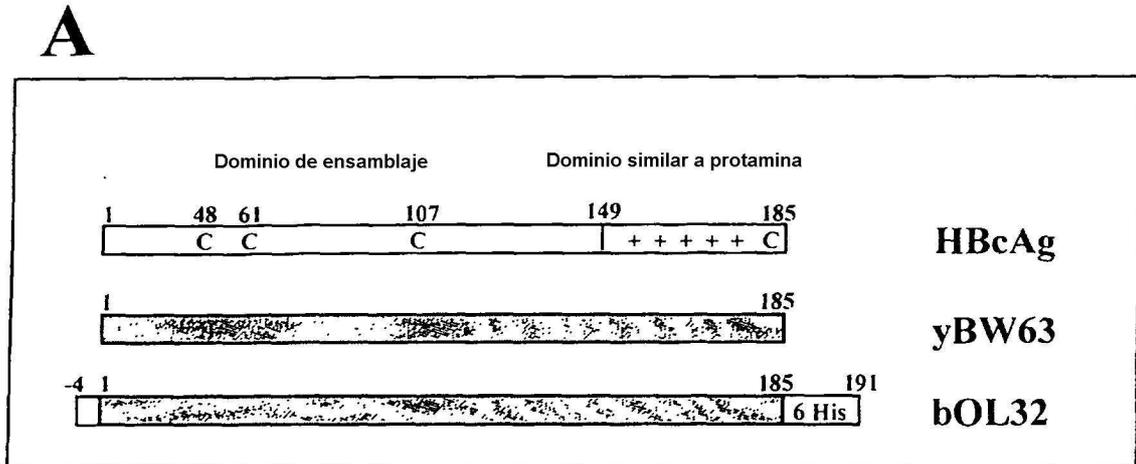
- se incuba la mezcla durante un tiempo predeterminado;

25 - se separa la fase sólida de la fase líquida; y

- se revela la posible presencia de anticuerpos anti-HBc midiendo el nivel de marcaje en la fase sólida.

30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína de HBcAg recombinante se produce mediante la expresión en células de levadura seleccionadas de entre el grupo que consiste en *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*.

FIGURA 1



B

```

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP 50
HHTALRQAIL CWGELMTLAT WVGNNLEDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL 100
LWFHISCLTF GRETVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR 150
RRDRGRSPRR RTPSPRRRRS QSPRRRRRSQS RESQC
    
```

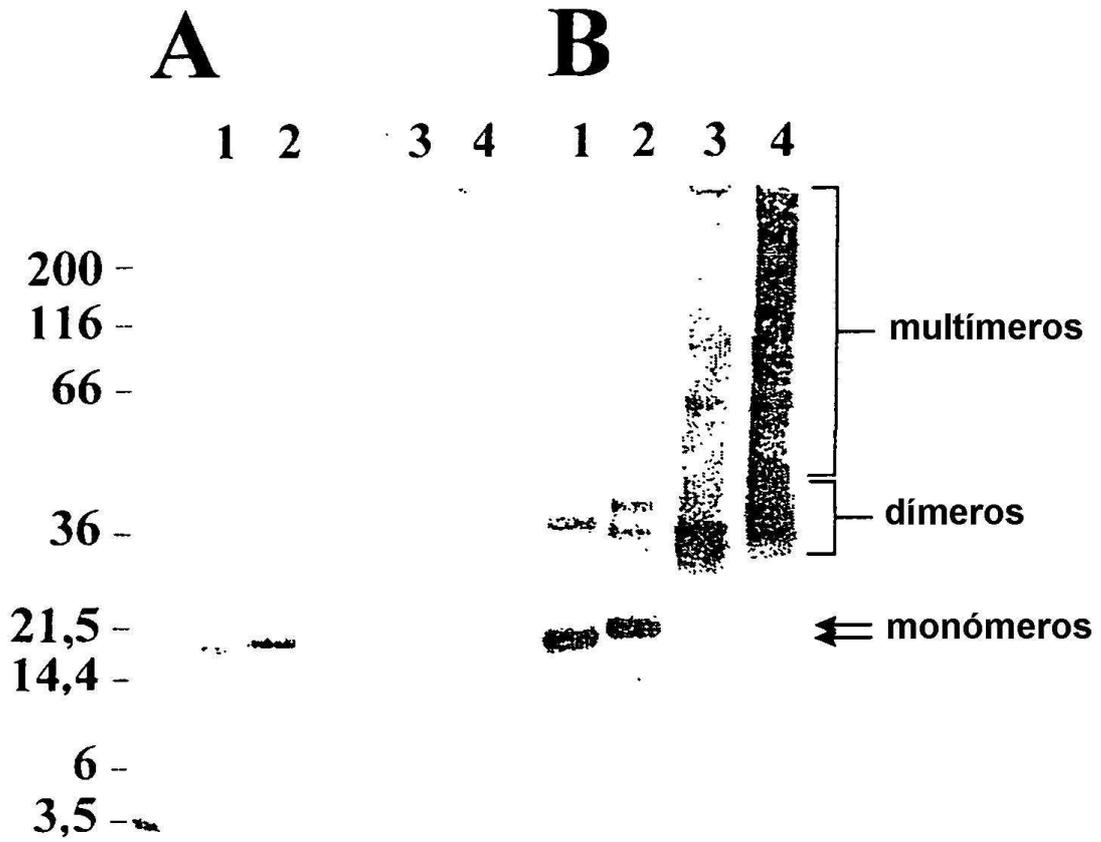


FIGURA 2

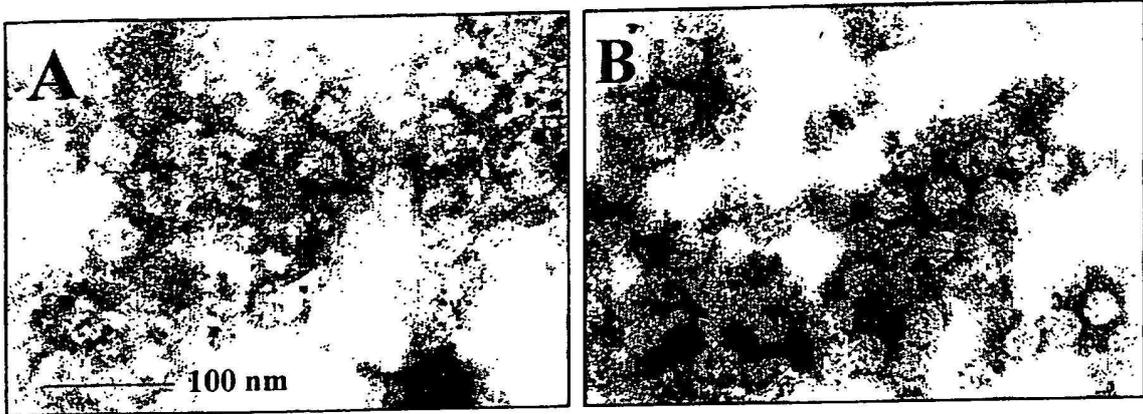


FIGURA 3

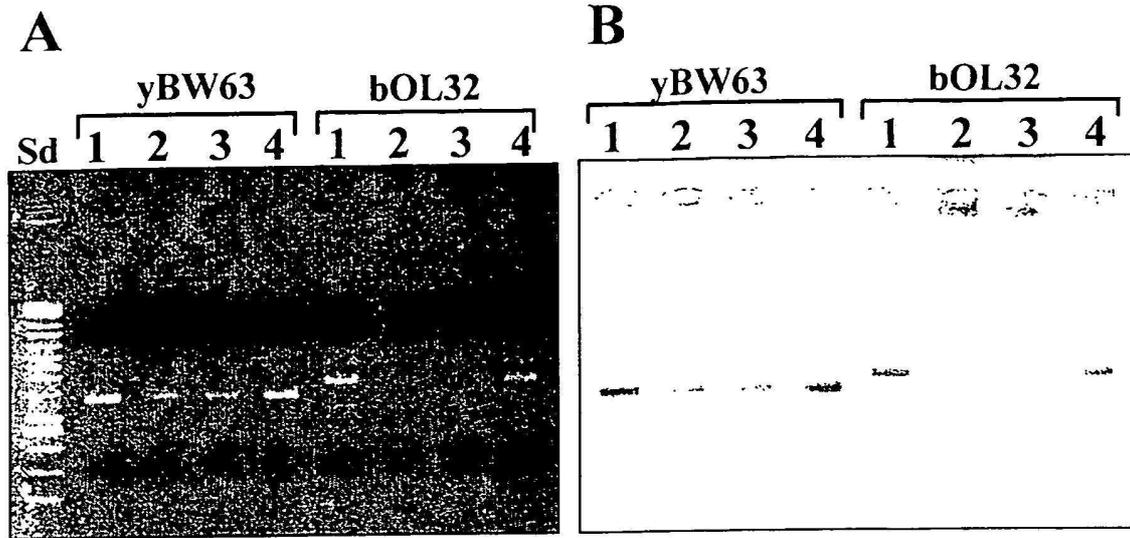


FIGURA 4