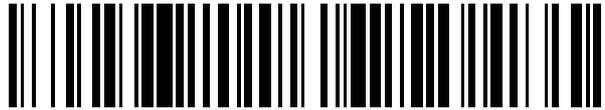


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 744**

51 Int. Cl.:

A61K 39/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2008 E 08704986 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2114450**

54 Título: **Vacuna del VHB y procedimiento de preparación de la misma**

30 Prioridad:

31.01.2007 KR 20070010167

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

14.01.2015

73 Titular/es:

**DOBEEL CO., LTD. (100.0%)
BYUCKSAN TECHNOPIA I 434-6 SANGDAEWON-
DO JUNGWON-GU SEONGNAM-SI
GYEONGGI-DO 462-716, KR**

72 Inventor/es:

**YUM, JUNG SUN;
AHN, BYUNG CHEOL;
JO, HYUN JIN;
KIM, DONG YEON;
LEE, JOO YOUN;
KIM, KI HYUN;
YOON, JAE SEUNG y
MOON, HONG MO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 526 744 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

Vacuna del VHB y procedimiento de preparación de la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una vacuna del virus de la hepatitis B (VHB) que comprende un antígeno de superficie de VHB completo recombinante que consiste en antígeno preS y antígeno S que comprende además un antígeno del núcleo del VHB además del antígeno de superficie completo, y a un procedimiento de preparación de la misma.

Técnica antecedente

10 La infección por VHB provoca hepatitis aguda y hepatitis crónica. La mayoría de los individuos que tienen infección por VHB se recuperan completamente de la infección del virus después de 1 a 2 meses, pero aproximadamente el 10 % de ellos se convierten en pacientes de hepatitis crónica. Dependiendo de la edad de la infección, la velocidad con que se convierte en infección crónica es mucho peor, mostrando más del 95 % para los neonatos de menos de 2 meses, reduciéndose a medida que aumenta la edad, y llegando a aproximadamente el 25 % para niños de cinco años de edad. La infección crónica del VHB provoca mayor riesgo de desarrollo de cirrosis hepática y cáncer. El

15 antígeno de superficie del VHB (HBsAg) se detecta en la sangre de pacientes con infección crónica de VHB, sin embargo, el anticuerpo anti HBsAg no aparece debido al desarrollo de tolerancia inmunitaria. Por lo tanto, el objetivo final para el tratamiento de la infección de VHB crónica es inducir anticuerpos anti HBsAg en el suero y eliminar el VHB de la sangre y el hígado.

20 La vacuna terapéutica descrita en la presente invención es adecuada para el tratamiento de infección crónica de VHB, por que detiene la tolerancia inmunitaria e induce respuesta inmunitaria contra el VHB para eliminar antígeno del VHB de la sangre. Las vacunas terapéuticas contra la infección crónica de VHB deberían cumplir los siguientes criterios; deben ser capaces de interrumpir la tolerancia inmunitaria e inducir respuestas inmunitarias contra el VHB, inducir fuerte inmunidad humoral y mediada por células para resolver la infección viral crónica.

25 Después de la infección por VHB, cuando se induzcan respuestas inmunitarias policlonales, se resolvería la infección. Por otro lado cuando se indujeran respuestas inmunitarias oligoclonales débiles, la infección conduciría a infección crónica. Este hallazgo sugiere que una vacuna terapéutica debe contener antígenos capaces de proporcionar diversos epítomos necesarios para inducir respuesta inmunitaria policlonal.

30 El gen del antígeno de la envoltura del VHB consiste en región preS (preS1 y preS2) y S, y después de la transcripción, se sintetizan tres proteínas de la envoltura (proteína L, proteína M y proteína S) por traducción alternativa en cada uno de los tres codones de inicio. La proteína L consiste en aproximadamente 400 aminoácidos dependiendo del subtipo de VHB, que comprende el dominio preS 1, dominio preS2 y dominio S, cuyo inicio de la traducción comienza en el codón AUG de preS1. La proteína M consiste en aproximadamente 281 aminoácidos, que comprenden el dominio preS2 y dominio S, cuyo inicio de la traducción comienza en preS2. La proteína S consiste en aproximadamente 226 aminoácidos, que comprenden solamente el dominio S, y compone la parte más

35 abundante en las partículas del virus. Los dominios S de estas proteínas de envoltura se incluyen en la membrana lipídica y forman partículas de 22 nm y 42 nm y forma de bastón dependiendo de la relación de tres proteínas de envoltura de tamaños diferentes. Los dominios preS1 y preS2 contenidos en proteínas M y L son altamente inmunogénicos y ayudan a inducir anticuerpos específicos de proteína S en ciertas cepas de ratones congénicas en las que la proteína S por sí sola no es inmunogénica.

40 Como se ha descrito anteriormente, es importante proporcionar conjuntos completos de epítomos específicos de antígenos de la envoltura y antígeno de VHB como formas de partículas altamente inmunogénicas, el desarrollo de una vacuna de VHB que contiene la proteína preS completa y proteína S es el objetivo de la presente invención. En particular, experimentos tanto animales como humanos han mostrado que la vacuna que contiene antígenos tanto preS como S puede inducir respuestas inmunitarias más fuertes y respuestas mucho más rápidas que la vacuna que contiene solamente antígeno S. Es decir, la vacuna que contiene antígenos tanto preS como S es más

45 inmunogénica e induce respuestas inmunitarias rápidas, en comparación con la vacuna que contiene solamente antígenos S, mostrando de este modo que la proteína L es más útil como una vacuna terapéutica para el tratamiento de hepatitis B crónica.

50 Sin embargo, la mayoría de las vacunas de VHB disponibles en el mercado contienen solamente proteína S. Esto podría deberse a que la expresión de proteína L en formas de partícula vistas en el paciente con VHB crónico no ha tenido éxito a partir de sistemas de expresión de células eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Hansenula polymorpha*.

55 Además, ha habido intentos de coexpresar una parte del antígeno preS (en particular, preS2) y el antígeno S en células eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Hansenula polymorpha*, sin embargo, no se descubrió que los productos tuvieran suficiente inmunogenicidad.

Además, ha habido otros intentos de producir antígenos de VHB, en los que el gen de preS se expresó por separado

para producir el antígeno preS solamente, y después se mezcló con antígeno S. Sin embargo, la forma soluble lineal producida de antígeno preS no fue muy inmunogénica. Por lo tanto, el intento de mejorar la inmunogenicidad no tuvo éxito en comparación con el antígeno de superficie completo, en el que el antígeno preS y antígeno S se coexpresan en formas de partículas y los antígenos preS se localizan en la superficie externa de las partículas.

- 5 En consecuencia, para mejorar la inmunogenicidad, hay que expresar simultáneamente los antígenos preS y S, y hay que localizar los antígenos preS en la superficie externa de partículas que consisten en antígenos S. Recientemente, Scigen ha desarrollado una vacuna de VHB en Israel y afirman que contiene el antígeno de superficie completa, es decir, los antígenos tanto preS como S.

Divulgación de la invención

10 Problema técnico

Los presentes inventores han desarrollado con éxito una línea celular CHO que puede producir antígeno de la envoltura del VHB que contiene antígenos preS y S en formas de partícula. Han descubierto que, cuando el gen de envoltura completo del virus de la hepatitis B se introdujo en un vector específico, se expresaban los tres tipos de proteínas de superficie (proteína L, proteína M y proteína S) en las formas de partículas vistas en la sangre de
15 pacientes con VHB crónico. Usando este antígeno, se ha desarrollado una vacuna de VHB fuerte que comprende el antígeno de superficie completo recombinante, y además se ha descubierto que es altamente eficaz en la inducción de respuestas inmunitarias fuertes en un ratón transgénico que produce antígeno de VHB en la sangre pero sin ninguna cantidad detectable de anticuerpo específico de VHB.

Solución técnica

20 Es un objeto de la presente invención proporcionar una vacuna de VHB que comprenda antígeno de superficie completo que consiste en tres tipos de proteínas de superficie (proteína L, proteína M y proteína S) en formas de partícula.

Preferentemente, es un objeto de la presente invención proporcionar la vacuna que comprende un antígeno de superficie de VHB, en el que la proteína L, la proteína M y la proteína S se coexpresan de un vector de expresión
25 que comprende el gen de envoltura completo que codifica los antígenos preS1, preS2 y S del virus de la hepatitis B, y los antígenos preS producidos se localizan en la superficie externa de partículas formadas por estos antígenos.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para preparar una vacuna de VHB potente.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un vector de expresión recombinante capaz de expresar los tres tipos de proteína de superficie (proteína L, proteína M y proteína S).

30 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una célula transformada con el vector de expresión recombinante.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una terapia inmunitaria adecuada para tratar la infección por VHB crónica como una forma de vacuna de VHB.

35 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una vacuna multiantígeno de VHB para potenciar la inmunidad tanto humoral como mediada por células preparada añadiendo un antígeno del núcleo de VHB recombinante y/o adyuvante a la vacuna.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un vector que expresa un antígeno de superficie completo recombinante (proteína S, proteína M, proteína L):

40 La Figura 2 es una fotografía de SDS-PAGE y transferencia de Western del antígeno de superficie completo recombinante purificado (proteína S, proteína M, proteína L)

La Figura 3 es una fotografía de transferencia de Western del antígeno de superficie completo recombinante purificado tratado con N-glucosidasa;

La Figura 4 es una fotografía de microscopio electrónico del antígeno de superficie completo recombinante;

45 La Figura 5 es una fotografía de SDS-PAGE y transferencia de Western del antígeno del núcleo recombinante purificado (Ag del núcleo);

La Figura 6 es una fotografía de microscopio electrónico del antígeno del núcleo recombinante purificado,

La Figura 7 muestra la comparación de títulos de anticuerpos entre la vacuna de VHB que comprende el antígeno de superficie completo de acuerdo con la presente invención y vacunas conocidas;

50 La Figura 8 muestra la comparación de DE₅₀ entre la vacuna de VHB que comprende el antígeno de superficie completo de acuerdo con la presente invención y vacunas conocidas;

La Figura 9 muestra la inducción de la respuesta inmunitaria humoral en ratón normal por la vacuna multiantígeno de acuerdo con la presente invención;

La Figura 10 muestra la inducción de respuesta inmunitaria mediada por células en ratón normal por la vacuna

multiantígeno de acuerdo con la presente invención;

La Figura 11 es una fotografía de microscopio electrónico de conjugado de oro coloidal revestido con preS;

La Figura 12 muestra la inducción de respuesta inmunitaria humoral en ratón normal por conjugado de oro coloidal;

5 La Figura 13 muestra la inducción de respuesta inmunitaria mediada por células en ratón normal por conjugado de oro coloidal;

La Figura 14 muestra la inducción de respuesta inmunitaria humoral en ratón normal por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención;

10 La Figura 15 muestra la inducción de respuesta inmunitaria mediada por célula en ratón normal por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención;

La Figura 16 muestra la inducción de respuesta humoral en ratón transgénico por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención;

La Figura 17 es el resultado de un ensayo de ELISPOT que muestra la inducción de la respuesta inmunitaria medida por células en ratón transgénico por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención;

15 La Figura 18 es el resultado del ensayo de ELISA que muestra la inducción de respuesta inmunitaria medida por células en ratón transgénico por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención;

La Figura 19 muestra la reducción de antígeno de superficie (partícula de tipo virus) en sangre por la vacuna terapéutica;

20 La Figura 20 muestra la reducción de la expresión de un gen viral y aumento de la expresión de interferón g por la vacuna terapéutica;

La Figura 21 muestra la inducción de respuesta inmunitaria humoral en ratón transgénico por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención;

La Figura 22 es el resultado de un ensayo de ELISPOT que muestra la inducción de la respuesta inmunitaria medida por células en ratón transgénico por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención;

25 La Figura 23 es el resultado de un ensayo de ELISA que muestra la inducción de respuesta inmunitaria mediada por células en ratón transgénico por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención; y

La Figura 24 muestra la reducción del antígeno de superficie (partícula de tipo virus) en sangre por la vacuna terapéutica de acuerdo con la presente invención.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

30 En una realización, la presente invención proporciona una vacuna de VHB, que comprende un antígeno de superficie completo recombinante que consiste en proteína L, proteína M y proteína S en formas de partícula y además el compuesto como se define en la reivindicación 1.

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) está compuesto de tres proteínas de la envoltura relacionadas que se sintetizan por el uso alternativo de tres codones de inicio de la traducción y un codón de parada común. La proteína HBsAg incluye un polipéptido principal de 226 aminoácidos, designada proteína S en una forma no glucosilada (p24) y glucosilada (gp27). La proteína de tamaño medio, proteína M tiene 55 aminoácidos adicionales en la región N terminal del dominio S, que se denomina un dominio preS2 correspondiente a gp33 y gp36. La proteína L mayor tiene 119 aminoácidos adicionales (dominio preS1) en la región N terminal de la proteína M que consiste en los dominios S y preS2, que se designa p39 y gp42 según la glucosilación. En las partículas HBsAg de envoltura nativa, los dominios S de la proteína L, proteína M y proteína S están unidos operativamente entre sí por enlaces disulfuro intermoleculares para formar partículas virales.

La importancia relativa de la respuesta inmunitaria para cada uno de los dominios S, preS2 y preS1 se entiende solo parcialmente, sin embargo, se ha indicado que la respuesta inmunitaria al antígeno preS potencia la inmunogenicidad del antígeno S (ref. Milich DR y col Science 228: 1195-1199, 1985; Milich DR y col J Immunol 23: 511-523, 1986; Milich DR y col Proc Natl. Acad Sci USA 85: 1610-1614, 1988). Además, se ha indicado que los anticuerpos contra antígenos preS bloquean la unión, endocitosis y posiblemente la penetración de membrana del virus de la hepatitis B en el hepatocito (Neurath AR y col. Nature 315: 154-156, 1985; Neurath AR y col. Vaccine 4: 35-37, 1986; Gerlich WH y col. Vaccine 8: S63-S68, 1990). En consecuencia, las vacunas del VHB de tercera generación que contienen antígenos tanto preS como S pueden inducir más eficazmente respuestas inmunitarias que las vacunas que contienen el antígeno S solamente.

De acuerdo con la presente invención, puede prepararse una vacuna del VHB que comprende un antígeno de superficie completo del VHB recombinante, en la que se incluye el antígeno de superficie completo del VHB recombinante que contiene proteínas S, M y L expresadas de un vector de expresión, y los antígenos preS que consisten en preS1 y preS2 se localizan en la superficie externa de partículas que se forman por enlaces entre antígenos S. La vacuna que comprende el antígeno de la presente invención es útil como una vacuna terapéutica, dado que induce respuestas inmunitarias mucho más fuertes en comparación con vacunas que contienen solamente antígenos S o vacunas que contienen los antígenos S y preS expresados por separado en una forma mixta.

Entre las vacunas del VHB conocidas, las vacunas del VHB de segunda generación contienen solamente el antígeno S, y las vacunas del VHB de tercera generación no contienen los tres antígenos de superficie, sino que contienen una parte del antígeno preS y del antígeno S o contienen cantidades apenas detectables del antígeno preS, incluso aunque contienen supuestamente antígenos tanto preS como S. Esto podría deberse a la pérdida de la parte preS

en el procedimiento de purificación. Por lo tanto, el antígeno de superficie producido puede no ser tan inmunogénico como un antígeno de superficie completo, o el antígeno preS y antígeno S se expresan por separado para estar presentes en una forma mixta. Por lo tanto, los antígenos en superficie producidos en las vacunas del VHB conocidas pueden no ser tan inmunogénicos como el antígeno de superficie completo, en el que los antígenos preS se coexpresan con antígenos S y se localizan en la superficie externa de partículas formadas por enlaces entre antígenos S.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona una vacuna del VHB recombinante que comprende el antígeno de superficie completo, que incluye los tres tipos coexpresados de proteínas de superficie del VHB a un nivel práctico para formar partículas de tipo virus, incluyendo partículas de 22 nm y 42 nm y forma de bastón.

La expresión "antígeno de superficie completo (L-HBsAg)" como se usa en el presente documento se refiere a un antígeno que incluye los tres tipos coexpresados de proteínas de superficie del VHB (proteínas S, M y L), en el que los antígenos preS que consisten en preS1 y preS2 se localizan en la superficie externa de partículas formadas por enlaces entre antígenos S.

La presente invención proporciona una vacuna del VHB que comprende además un antígeno del núcleo del VHB, además del antígeno de superficie del VHB completo, como se define en la reivindicación 1.

El antígeno del núcleo del VHB se caracteriza por que forma una partícula de tipo virus, muestra alta inmunogenicidad, e induce fuerte inmunidad mediada por células. Por lo tanto, se espera que las vacunas que comprenden además el antígeno del núcleo además del antígeno de superficie del VHB completo induzcan respuestas inmunitarias fuertes, siendo por lo tanto útiles como una vacuna terapéutica, lo que se confirma en el Ejemplo 3. Es decir, se ha encontrado que la vacuna que comprende tanto el antígeno de superficie del VHB completo como el antígeno del núcleo induce más eficazmente respuestas inmunitarias mediadas por células que la vacuna que comprende el antígeno de superficie del VHB completo solamente. Por lo tanto, se ha descubierto que la vacuna que comprende tanto el antígeno de superficie del VHB completo como el antígeno del núcleo es más útil como una vacuna terapéutica.

Como se describe posteriormente en detalle, la vacuna que comprende además el antígeno del núcleo del VHB puede prepararse mezclando el antígeno del núcleo del VHB con el antígeno de superficie del VHB completo preparado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. En las realizaciones de la presente invención, la vacuna del VHB que comprende solamente el antígeno de superficie del VHB completo de acuerdo con la presente invención se abrevia a vacuna de antígeno individual, y la vacuna del VHB que comprende tanto el antígeno de superficie del VHB completo como el antígeno del núcleo de acuerdo con la presente invención se abrevia a vacuna multiantígeno.

La presente invención puede proporcionarse usando un vector de expresión recombinante que puede coexpresar eficazmente todas las proteínas de superficie, que constituye proteínas de la envoltura del VHB como se ve en VHB en la sangre de un paciente con VHB crónico.

Como se ha descrito anteriormente, la vacuna del VHB más potente de la presente invención puede prepararse coexpresando tres tipos de proteína de superficie de un vector de expresión, en el que el vector de expresión recombinante comprende el gen de envoltura del VHB, es decir, un polinucleótido completo que codifica las regiones preS1, preS2 y S. Preferentemente, la secuencia de bases puede proporcionarse en forma de gen de envoltura del VHB completo, y más preferentemente gen de envoltura del VHB representado por SEC ID N°:1.

Además, como un vector para la preparación del vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención, puede usarse preferentemente un vector pMSG (documento KCCM10202), desvelado en la Solicitud de Patente Coreana N° 10-2000-0043996 y el documento PCT/KR01/01285. El vector pMSG contiene una secuencia complementaria de MAR beta globina; un promotor del virus SV40; y un terminador de la transcripción que tiene una secuencia de bases específica, y es un vector capaz de expresar eficazmente genes ajenos en células animales. El vector de expresión puede producir con éxito proteínas recombinantes en diversas células animales, y producir una proteína recombinante que tiene la misma estructura y función en comparación con proteína de tipo silvestre. El vector pMSG se describe en detalle en la publicación de Patente Coreana 10-2007-0122056.

En una realización específica de la presente invención, el gen de envoltura completo que codifica el antígeno de superficie del VHB completo se insertó en el vector pMSG para confirmar si todas las proteínas L, M y S se expresaban o no (véase Figura 2). Además, se ha descubierto que las proteínas L, M y S recombinantes producidas forman partículas de tipo virus (véase Figura 4) y proporcionan los antígenos de superficie, antígeno preS (preS1 y preS2) y antígeno S (véase Ejemplo 1.1).

En otra realización más, la presente invención proporciona una célula huésped introducida con el vector de expresión. La célula huésped puede ser preferentemente, pero sin limitación, células animales, más preferentemente seleccionarse del grupo que consiste en células CHO (Ovario de Hámster Chino), hepatocitos, célula HEK (Riñón Embrionario Humano) y HLF (Fibroblasto de Pulmón Humano), y más preferentemente célula CHO.

En la realización preferida de la presente invención, se ha descubierto que el vector de expresión que alberga el gen de envoltura del VHB completo de acuerdo con la presente invención se introdujo en células CHO para producir en masa proteínas L, M y S (véase Ejemplo 1.1 y Figura 2). En consecuencia, la línea celular capaz de coexpresar proteínas L, M y S, preparada transformando células CHO con el vector de expresión de acuerdo con la presente invención, se designa CHO DG44/L-HBsAg(J2.1)-G101, que se depositó en el Instituto de Biociencia y Biotecnología de Corea (Colección Coreana de Cultivos Tipo, Ueun-dong, Yusung-gu, Daejeon-si, Corea) el 28 de diciembre de 2006 con el número de referencia KCTC 11058BP.

La presente invención proporciona además un procedimiento para preparar la vacuna del VHB que comprende el antígeno de superficie del VHB completo, que comprende las etapas de la reivindicación 3.

Como se ha descrito anteriormente, la línea celular, que se transforma con el vector de expresión recombinante que alberga el gen de envoltura del VHB completo de acuerdo con la presente invención, coexpresa las proteínas L, M y S, y los antígenos S coexpresados se unen covalentemente entre sí para formar partículas, y los antígenos preS coexpresados se localizan en la superficie externa de partículas, para formar partículas de tipo virus. En consecuencia, los antígenos de superficie del VHB completos expresados en las líneas celulares se purifican para preparar la vacuna del VHB que comprende el antígeno de superficie del VHB completo de acuerdo con la presente invención.

Específicamente, el procedimiento para preparar la vacuna del VHB de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de

- 1) introducir un polinucleótido que codifica antígeno preS y S del VHB en un vector de expresión;
- 2) transformar una célula huésped con el vector de expresión de la etapa 1); y
- 3) cultivar la célula huésped transformada para recuperar un antígeno de superficie completo del VHB recombinante (antígeno preS y antígeno S).

El polinucleótido de la etapa 1) es preferentemente una forma del gen de envoltura completo del virus de la hepatitis B (VHB), más preferentemente una región codifican para el gen de envoltura del VHB y una 3' UTR completa que contiene un sitio de poliadenilación, y más preferentemente un polinucleótido que tiene una secuencia de bases de SEC ID N°: 1. El vector de expresión de la etapa 1) es preferentemente un vector pMSG (documento KCCM 10202). La célula huésped puede ser preferentemente, pero sin limitación, una célula CHO.

La vacuna que comprende además un antígeno del núcleo del VHB además del antígeno de superficie del VHB completo puede prepararse fácilmente mezclando el antígeno de superficie del VHB completo obtenido por el procedimiento de preparación de la presente invención con el antígeno del núcleo del VHB preparado por una técnica de recombinación genética conocida en el campo relacionado. Específicamente, las siguientes etapas 4) a 6) se incluyen en el procedimiento de preparación de la vacuna del VHB que comprende las etapas 1) a 3) para preparar la vacuna que comprende el antígeno de superficie del VHB completo y el antígeno del núcleo del VHB:

- 4) introducir un polinucleótido que codifica una proteína del núcleo del VHB en un vector de expresión;
- 5) transformar una célula huésped con el vector de expresión de la etapa 4); y
- 6) cultivar la célula huésped transformada para recuperar una proteína del núcleo del VHB recombinante.

El vector de expresión de la etapa 4) puede ser preferentemente, pero sin limitación, un vector pBluescript, un vector de expresión pGEX, un vector de expresión pET, un vector de expresión pIL20, un vector de expresión pET11a o similares. El vector de expresión puede introducirse en células procariotas o eucariotas. Los ejemplos preferidos de las mismas incluyen células procariotas tales como *E. coli* y *B. subtilis*, y células eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*, pero sin limitación, y más preferentemente *E. coli*.

En otra realización más, la presente invención proporciona una composición de vacuna del VHB que comprende un adyuvante.

Como se usa en el presente documento, "adyuvante" se refiere a una sustancia o complemento que no puede inducir por sí sola inmunidad específica, pero puede estimular el sistema inmunitario para aumentar las respuestas inmunitarias contra un antígeno específico. Es decir, las vacunas que contienen tanto antígeno como adyuvante inducen respuesta inmunitaria más fuerte que las vacunas que contienen solamente antígeno.

En la presente invención, pueden usarse compuestos de aluminio (sulfato de aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc.) como un adyuvante. También puede usarse oro coloidal como un adyuvante. En particular, los presentes inventores han desvelado que el oro coloidal puede usarse como un adyuvante para potenciar significativamente la respuesta inmunitaria mediada por células (Publicación de Patente Coreana N° 10-2007-0122056). Cuando la vacuna del VHB de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento de la hepatitis B crónica, se requiere más su capacidad para inducir respuesta inmunitaria mediada por células. Se ha descubierto que la vacuna que contiene oro coloidal como un adyuvante puede inducir más eficazmente la respuesta inmunitaria mediada por células, usándose por lo tanto como una mejor vacuna terapéutica (véase Ejemplo 5.2 y Figura 13).

Más preferentemente, el oro coloidal puede usarse con alumbre como un adyuvante. El alumbre actúa potenciando la inmunidad humoral. Por lo tanto, cuando tanto el alumbre como el oro coloidal se emplean como un adyuvante para la preparación de vacuna terapéutica, puede inducirse eficazmente inmunidad tanto humoral como mediada por células. Se ha descubierto que tras el uso de alumbre con oro coloidal como un adyuvante, la vacuna multiantígeno del VHB de acuerdo con la presente invención puede inducir más eficazmente inmunidad tanto humoral como mediada por células (véase Ejemplo 6.2 y Figura 15).

En otra realización más, la presente invención proporciona una vacuna del VHB terapéutica. Las vacunas terapéuticas son adecuadas para el tratamiento de infecciones crónicas, ya que rompen la naturaleza inmunitaria e inducen respuesta inmunitaria contra infección para recuperarse de la afección infecciosa. Esta utilidad se ha demostrado en un modelo animal transgénico que produce antígeno de la envoltura del VHB en el suero pero no produce ninguna cantidad detectable de anticuerpo contra el antígeno del VHB. La vacuna del VHB de la presente invención indujo una respuesta inmunitaria mediada por células fuerte así como respuesta inmunitaria humoral. En consecuencia, la vacuna del VHB de la presente invención es adecuada como una vacuna terapéutica. Es preferible que la vacuna del VHB de la presente invención contenga adyuvante. El adyuvante puede ser alumbre, oro coloidal o ambos.

La composición de la vacuna de la presente invención puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables y formulados para uso humano o veterinario para administrar mediante diversas vías. Los ejemplos de las vías de administración pueden incluir vías orales, intraperitoneales, intravenosas, intramusculares, subcutáneas e intradérmicas. La composición de vacuna se formula preferentemente en preparaciones inyectables. La preparación inyectable puede formularse usando soluciones acuosas tales como solución salina o solución de Ringer, y soluciones no acuosas tales como aceite vegetal, éster de ácidos grasos superiores (por ejemplo, etil oleato) y alcoholes (por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, propilenglicol o glicerina). Además, la preparación inyectable puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un estabilizador para evitar la degradación (por ejemplo, ácido ascórbico, bisulfito sódico, pirobisulfito sódico, BHA, tocoferol y EDTA), un emulsionante, un agente tamponante para ajustar el pH y un conservante antimicrobiano (por ejemplo, nitrato fenilmercurio, timerosal, cloruro de benzalconio, fenol, cresol y alcohol bencílico).

La composición de la presente invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La frase "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para ejercer los efectos de la vacuna, y además una cantidad que no provoque una reacción adversa, o respuesta inmunitaria grave o excesiva. Una concentración exacta de la administración varía dependiendo del antígeno para administrar, y puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia, dependiendo de los factores bien conocidos en el campo médico incluyendo la edad del paciente, su peso, condición de salud, sexo y sensibilidad al fármaco, vía de administración y procedimiento de administración, y puede administrarse una vez o múltiples veces.

La presente invención puede usarse en un procedimiento para tratar la hepatitis B crónica usando la composición de vacuna.

Modo de la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solamente para fines ilustrativos, y no se pretende que la invención se limite a estos Ejemplos.

Ejemplo 1. Preparación de vacuna del VHB

1.1. Preparación de antígeno de superficie completo recombinante (antígenos preS y S; L-HBsAg)

(1)-1 Clonación

Se realizó una PCR usando un vector que contenía el genoma del VHB (HBV315, Korean Biochem. J. 17: 70-79, 1984) como un molde para amplificar una región codificante del gen de la envoltura (preS1-preS2-S) y una 3'-UTR completa que contenía un sitio de poliadenilación (SEC ID N°: 1), y después se introdujo en un vector de expresión. En este momento, se realizó una PCR usando un ADN polimerasa *Pfu*, y se prepararon cebadores para amplificar la región codificante de HBsAg y la 3'-UTR completa (cebador directo: 5-GGA AGA TCT CAA TCT CGG GAA-3 (SEC ID N°: 2), cebador inverso: 5-GGA AGA TCT CGA ATA GAA GGA AAG-3 (SEC ID N°: 3), la secuencia de reconocimiento de *Bgl*II está subrayada). Se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 2,75 kpb, y se ligó con un vector pMSG (véase publicación de Patente Coreana 10-2007-0122056 y documento WO 2002/014525) que se linealizó con enzima *Bgl*II. El vector preparado (pMSG-L-HBsAg) se ilustró esquemáticamente en la Figura 1. Las células CHO se transformaron con el vector para proporcionar transformantes, y se realizó una transferencia de Western para confirmar la expresión del antígeno de superficie completo (L-HBsAg, SEC ID N°: 4), seguido de exploración de transformantes con respecto a expresión de alto nivel. Los transformantes seleccionados se designaron CHO DG44/L-HBsAg(J2.1)-G101, que se depositó en el Instituto Coreano de Biociencia y Biotecnología (Colección Coreana de Cultivos Tipo, Ueun-dong, Yusung-gu, Daejeon-si, Corea) el 28 de diciembre de 2006 con el número de referencia KCTC 11058BP.

(1)-2 Establecimiento de línea celular en cultivos en suspensión

La línea celular seleccionada (5×10^5 células) se inoculó en un matraz T-175. La línea celular se cultivó en medio que contenía suero al 10 %, y las células unidas se trataron con tripsina al 0,25 %. Después, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos para retirar la tripsina residual. Las células individuales se resuspendieron en medio sin proteínas (HyQ SFM4CHO, Hyclone), se inocularon en matraces de agitación de 250 ml con 100 ml de volumen de trabajo, y se cultivaron a 80 rpm y 37 °C. Las células se inocularon a la concentración inicial de 5×10^5 células/ml. Cuando la concentración de las células se acercó a $1,5 \times 10^6$ células/ml, las células se subcultivaron continuamente usando la misma concentración inicial. Finalmente, se obtuvieron las líneas celulares adaptadas a cultivo en suspensión.

(2) Cultivo

Se preparó la inoculación celular subcultivando a partir de MCB (Master Cell Bank). En este momento, se usaron medios sin suero (HyQ SFM4CHO, Hyclone) como un medio básico, y las células se inocularon a la concentración de 5×10^5 células/ml en matraces de agitación de 250 ml y se cultivaron a 34 °C y 80 rpm. Después de tres días, las células se subcultivaron en matraces de agitación de 1 l para expandir el número de células. Después, las células se inocularon en un biorreactor de 7,5 l y se cultivaron a pH 7,2, 34 °C y a la velocidad de agitación de 80 rpm. Después de tres días, se añadió ácido cítrico y HyQ LS1000, y las células se cultivaron durante otros tres días.

(3) Purificación

El medio de cultivo recuperado del biorreactor se centrifugó para retirar los residuos celulares y se pasó a través de un filtro de 0,45 μ m para retirar las impurezas. El antígeno de superficie del VHB expresado se purificó por una cromatografía de fenil-sepharose equilibrada, cromatografía de DEAE-sepharose, y cromatografía de sepharose 4 FF. Se ha descubierto que el antígeno de superficie completo purificado consiste en proteína S, proteína M y proteína L, y consiste en seis tipos de proteínas recombinantes dependiendo de la glucosilación (Figura 2). La Figura 2A muestra el resultado de SDS-PAGE del antígeno de superficie completo purificado, y la Figura 2B muestra el resultado de la transferencia de Western del antígeno de superficie completo purificado usando anticuerpo anti S (Carril 1), anticuerpo anti preS1 (Carril 2) y anticuerpo anti preS2 (Carril 3). Se confirmó la glucosilación de la región S y región preS2 de la proteína M usando N-glucosidasaF (Figura 3). Además, se descubrió que el L-HBsAg purificado formaba partículas de tipo viral por observación de microscopía electrónica (Figura 4).

1.2 Preparación del antígeno del núcleo recombinante (HBcAg)

(1) Clonación

Las secuencias de aminoácidos N° 1 a 149, excepto el grupo de arginina en el extremo C terminal del antígeno del núcleo, se expresaron como una proteína recombinante (SEC ID N°: 5). La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína se representa por SEC ID N°: 6. Se realizó una PCR usando un vector que contenían el genoma del VHB (HBV315) como un molde para amplificar la región correspondiente. El gen amplificado se insertó en los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* de un vector pET11a (Novagen) para preparar un vector de expresión del núcleo pET11a. Para la amplificación por PCR del gen del núcleo, se usaron cebador directo: 5-CCC CAT ATG GAC ATT GAC CCG TA-3 (SEC ID N°: 7) y cebador inverso: 5-CGC GGA TCC AAC AAC AGT AGT TTC CGG-3 (SEC ID N°: 8). Se transformó *E. coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión del núcleo pET11a. Su expresión se confirmó y se seleccionaron los clones de alta producción.

(2) Cultivo de cepa de producción transformada

Se determinaron las condiciones de producción óptimas para la cepa de producción usando un fermentador de 5 l. Se usaron los medios que contenían Bacto Triptona 2 %, extracto de Levadura 1 %, NaCl 2 %, Glucosa 2 %, KH_2PO_4 1,33 %, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,4 %, ácido Cítrico 0,17 %, MgSO_4 0,12 %, Tiamina-HCl 0,01 % y Ampicilina 0,0371 %. La cepa se cultivó a 37 °C durante 11 horas, y después se añadió IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) en una cantidad de 0,05 mM/g de células. Después, las células se sometieron a inducción por IPTG durante 18 horas, y se recogieron.

(3) Purificación de proteína recombinante

Las células se recogieron, y se lavaron tres veces con un tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 0,2 mM). Después se añadió el tampón de lisis, y las células se rompieron por sonicación. El sobrenadante se recogió por centrifugación, y se incubó a 65 °C durante 30 minutos. Después el sobrenadante se recogió por centrifugación, y se añadió sulfato de amonio al 30 % al mismo para precipitar antígenos del núcleo. Después de la centrifugación, el precipitado se disolvió en Tris-Cl 50 mM (pH 7,6) y se pasó a través de una columna de butil sepharose para aislar los antígenos del núcleo puros.

Se descubrió que los antígenos del núcleo recombinantes purificados formaban multímeros en una forma de partícula (Figura 5). La Figura 5A muestra el resultado de SDS-PAGE del antígeno del núcleo recombinante purificado, y la Figura 5B muestra el resultado de transferencia de Western del antígeno del núcleo recombinante

purificado. La multimerización se confirmó en condiciones reductoras y no reductoras. Además, se descubrió que los antígenos del núcleo recombinantes purificados formaban partículas por observación electromicroscópica (Figura 6),

Se descubrió que los antígenos del núcleo recombinantes purificados formaban partículas de tipo virus y eran altamente inmunogénicos e inducían inmunidad mediada por células fuerte (en el siguiente Ejemplo).

5 Ejemplo 2. Comparación de inmunogenicidad de antígeno de superficie completo recombinante (L-HBsAg)

Para confirmar si el antígeno de superficie completo recombinante (L-HBsAg) de la presente invención es altamente inmunogénico e induce fuertes respuestas inmunitarias, se realizó un ensayo animal para comparar con vacunas del VHB de segunda generación conocidas.

2.1. Comparación de inmunogenicidad

10 (1) Fin: se compararon el título de anticuerpos y la inducción de respuesta inmunitaria por el antígeno L-HBsAg recombinante.

(2) Material y procedimiento

(a) Animal experimental: ratones hembra de 6 semanas de edad C57BL/6.

(b) Vacuna de ensayo

15 Se adsorbió el antígeno de superficie completo (L-HBsAg) preparado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1-1 en alumbre para preparar una vacuna de ensayo. Como grupo de control, se usó un antígeno S recombinante producido en *Hansenula polymorpha* (Hepavax-Gene, Green Cross Co.) y antígeno S recombinante producido en células CHO, que no contenían antígeno preS (Vacuna de Hepatitis B Recombinante, Hualton, China). Se usaron 0,5 □ de cada antígeno por dosis.

20 (c) Grupo de inmunización y condiciones de inmunización

- Grupo de inmunización

1. Grupo 1: antígeno S recombinante producido en *Hansenula polymorpha* (Hepavax-Gene, Green Cross Co.)
2. Grupo 2: antígeno S recombinante producido en células CHO (Vacuna de Hepatitis B Recombinante, Hualton, China)
- 25 3. Grupo 3: antígeno L-HBsAg recombinante producido en células CHO, preparado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1-1

- Procedimiento de administración; cada vacuna de ensayo se administró por inyección intramuscular tres veces a intervalos de dos semanas.

(d) Procedimiento de análisis de la respuesta inmunitaria

30 Se determinó el título de anticuerpos como unidades internacionales (mUI/ml) usando un kit de Diasorin para analizar las respuestas inmunitarias humorales inducidas por cada vacuna de ensayo.

(3) Resultado

35 Se descubrió que el L-HBsAg recombinante de acuerdo con la presente invención inducía una respuesta inmunitaria humoral más fuerte para mostrar mayor título de anticuerpos, en comparación con los antígenos S recombinantes usados en las vacunas conocidas (Figura 7). Es decir, se descubrió que el L-HBsAg recombinante tenía mayor inmunogenicidad que los antígenos conocidos. Además, se descubrió que el L-HBsAg recombinante inducía una respuesta inmunitaria más rápida, en comparación con el antígeno S producido en *Hansenula polymorpha*.

2.2. Comparación de valores DE50

40 (1) Fin: se comparó la inmunogenicidad del antígeno L-HbsAg recombinante, preparado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1-1 por DE50 (Dosis Eficaz), que es la cantidad mínima de antígeno requerida para seroconversión en el 50 % de los ratones.

(2) Material y procedimiento

(a) Animal experimental: ratones hembra de 6 semanas de edad C57BL/6

(b) Vacuna de ensayo

45 Se adsorbió el antígeno de superficie completo (L-HBsAg) preparado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1-1 en alumbre para preparar una vacuna de ensayo. Como grupo de control, se usó un antígeno S recombinante producido en levadura (Vacuna de Hepatitis B Recombinante, Kangtai, China) y antígeno S recombinante producido

en células CHO, que no contienen antígeno preS (Vacuna de Hepatitis B Recombinante, Hualton, China).

Cada vacuna se diluyó para preparar vacunas que contenían 0,156 μ g, 0,312 μ g, 0,625 μ g, 1,25 μ g, 2,5 μ g, y 5 μ g de cada antígeno por dosis

(c) Grupo de inmunización y condición de inmunización

5 - Grupo de inmunización. Cada grupo se dividió en seis subgrupos que consistían en 10 ratones, y cada subgrupo se inmunizó con cada vacuna diluida.

10 1. Grupo 1: antígeno S recombinante producido en levadura (Vacuna de Hepatitis B Recombinante, Kangtai, China) (Grupo 1-1: administración de 0,156 μ g, Grupo 1-2: administración de 0,312 μ g, Grupo 1-3: administración de 0,625 μ g, Grupo 1-4: administración de 1,25 μ g, Grupo 1-5: administración de 2,5 μ g, Grupo 1-6: administración de 5 μ g)

2. Grupo 2: antígeno S recombinante producido en células CHO, usado en el Ejemplo 2-1 como grupo de control (Vacuna de Hepatitis B Recombinante, Hualton, China) (Grupo 2-1: administración de 0,156 μ g, Grupo 2-2: administración de 0,312 μ g, Grupo 2-3: administración de 0,625 μ g, Grupo 2-4: administración de 1,25 μ g, Grupo 2-5: administración de 2,5 μ g, Grupo 2-6: administración de 5 μ g)

15 3. Grupo 3: antígeno L-HBsAg recombinante producido en células CHO, preparado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1-1 (Grupo 3-1: administración de 0,156 μ g, Grupo 3-2: administración de 0,312 μ g, Grupo 3-3: administración de 0,625 μ g, Grupo 3-4: administración de 1,25 μ g, Grupo 3-5: administración de 2,5 μ g, Grupo 3-6: administración de 5 μ g)

- Procedimiento de administración: cada vacuna de ensayo se administró por inyección intraperitoneal una vez.

20 (d) Procedimiento de análisis de la respuesta inmunitaria

Se determinó el título de anticuerpos como unidades internacionales (mUI/ml) usando un kit Diasorin para analizar las respuestas inmunitarias humorales inducidas en cada individuo. El título de anticuerpos de 10 mUI/ml se definió como seroconversión. En cada grupo, se determinó la cantidad de antígeno requerida para seroconversión en el 50 % de los ratones inmunizados (DE50).

25 (3) Resultado

La vacuna que contiene el antígeno L-HBsAg recombinante preparado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1-1 tiene el menor valor DE50, en comparación con las vacunas conocidas. Es decir, se ha descubierto que el L-HbsAg recombinante de acuerdo con la presente invención induce eficazmente respuesta inmunitaria humoral, en comparación con los antígenos conocidos (Figura 8).

30 **Ejemplo 3. Comparación de respuesta inmunitaria por vacuna de VHB**

3.1 Condiciones para el experimento de inmunización y el procedimiento de análisis

35 (1) Fin: para confirmar la eficacia de la vacuna de VHB preparada de acuerdo con la presente invención, se inmunizaron ratones con la vacuna que contenía solamente el antígeno de superficie del VHB completo (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "vacuna de antígeno individual" o la vacuna que contiene tanto el antígeno de superficie del VHB completo como el antígeno del núcleo (en lo sucesivo en el presente documento, denominada "vacuna multiantígeno" para analizar las respuestas inmunitarias inducidas.

(2) Material y procedimiento

(a) Animal experimental: ratones hembra de 6 semanas de edad C57BL/6

(b) Vacuna de ensayo

40 Cada uno del antígeno del núcleo recombinante y antígeno de superficie completo preparados y purificados en el Ejemplo 1 se adsorbió en alumbre para preparar vacunas de antígenos individuales. El antígeno del núcleo recombinante y antígeno de superficie completo adsorbidos en alumbre se mezclaron entre sí para preparar una vacuna multiantígeno. Se usaron 0,5 μ g de cada antígeno por dosis.

(c) Grupo de inmunización y condición de inmunización

45 - Grupo de inmunización

1. Grupo 1: control negativo inmunizado con PBS (solución salina tamponada con Fosfato)

2. Grupo 2: antígeno de superficie completo recombinante adsorbido en alumbre

3. Grupo 3: antígeno de núcleo recombinante adsorbido en alumbre

50 4. Grupo 4: antígeno de superficie completo recombinante y antígeno de núcleo recombinante adsorbido en alumbre (vacuna multiantígeno)

- Procedimiento de administración: cada vacuna de ensayo se administró por inyección intramuscular tres veces a intervalos de dos semanas.

(d) Procedimiento de análisis de la respuesta inmunitaria

1) Análisis de la respuesta inmunitaria humoral

5 Se separaron sueros preinmunitarios y sueros a las 2 semanas después de la inmunización, y los anticuerpos producidos en los sueros se analizaron por ELISA para determinar el título de anticuerpos. En primer lugar, se revistieron microplacas de 96 pocillos con cada antígeno purificado a una concentración de 100 ng/pocillo, y se bloquearon con albúmina de suero bovino (1 %) durante 1 hora. Se lavaron las microplacas. Los sueros diluidos en series se añadieron a cada pocillo, y se sometieron a reacción a 37 °C durante 2 horas. Después se añadió anti IgG de ratón-HRP como un anticuerpo secundario, y se sometió a reacción durante 1 hora en las mismas condiciones. Después de lavar, se añadió un agente de revelado y se sometió a reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se midió el valor de DO a 450 nm usando un lector de ELISA. El título del anticuerpo se definió como la inversa del factor de dilución al que el valor de DO era tres veces mayor que el control negativo.

2) Análisis de la respuesta inmunitaria mediada por células

15 Después de la última inmunización, se tomaron los bazos de todos los ratones, y se aislaron y cultivaron los esplenocitos totales. Los esplenocitos secretores de interferón gamma se analizaron por un ensayo de ELISPOT para confirmar la respuesta inmunitaria mediada por células.

A las 2 semanas después de la inmunización terciaria, los bazos separados de cada ratón se pusieron en un tamiz celular, y se trituraron. Después, los glóbulos rojos se retiraron completamente usando un tampón de lisis RBC, y se aislaron los esplenocitos. Los esplenocitos aislados se cultivaron en medio completo (glutamina 1 X y antibióticos 1 X en medio RPMI1640). Para observar las respuestas inmunitarias que son específicas para cada antígeno, se añadieron el antígeno del núcleo y antígeno de superficie completo al medio de cultivo a una concentración de 1 μ g/ml para estimular las células inmunitarias específicas de antígeno. Después, se analizó el número de células secretoras de IFN-gamma (indicación de la respuesta inmunitaria mediada por células) por el ensayo de ELISPOT (BD Biosciences).

3.2 Efecto en la respuesta inmunitaria humoral

En el grupo al que se administró vacuna multiantígeno que contenía tanto el antígeno de superficie completo recombinante (L-HBsAg) como el antígeno del núcleo recombinante, los anticuerpos anti HB se indujeron más rápido, en comparación con la vacuna del antígeno individual que contenía solamente el antígeno de superficie completo recombinante (L-HBsAg) (Figura 9). En el caso de mezcla con el antígeno de núcleo recombinante, se observó el efecto de la potenciación de la respuesta inmunitaria humoral. Sin embargo, después de la última inmunización, la vacuna de un único antígeno y vacuna multiantígeno mostraron los mismos títulos de anticuerpo.

3.3 Efecto en la respuesta inmunitaria mediada por células

En el grupo al que se administró vacuna multiantígeno que contenía tanto el antígeno de superficie completo recombinante (L-HBsAg) como el antígeno del núcleo recombinante, se observó una respuesta inmunitaria medida por células mayor, en comparación con la vacuna del antígeno individual que contenía solamente el antígeno de superficie completo recombinante (L-HBsAg) o la vacuna de antígeno individual que contenía solamente el antígeno de núcleo recombinante (Figura 10). En el caso de mezcla con el antígeno de núcleo recombinante, la respuesta inmunitaria mediada por células puede inducirse más eficazmente. En consecuencia, la vacuna multiantígeno se usa preferentemente como una vacuna terapéutica para la inducción de respuesta inmunitaria mediada por células.

Ejemplo 4. Preparación de adyuvante de oro coloidal

4.1. Preparación de oro coloidal

Se preparó oro coloidal por un procedimiento basado en el procedimiento de citrato sódico, que se desarrolló por Frens (Frens G, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solutions. Nature Phys. Sci. 241: 20, 1973). Se disolvieron 0,2 g de cloruro de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 10 ml de agua destilada para preparar una solución de reserva de oro al 2 %. Se calentaron 100 ml de agua destilada con agitación, y se añadió 1 ml de la solución de reserva de oro al 2 % hasta una concentración final de 0,02 % y se mantuvo con calor y agitación durante aproximadamente 5 minutos. Se añadió solución de citrato sódico al 10 % hasta una concentración final de 0,032 a 0,036 %, y se mantuvo con calor y agitación durante 5 a 10 minutos. En este tiempo, el color de la solución era inicialmente gris, cambió gradualmente hasta violeta, y después de 1 a 3 minutos, cambió a rojo. La solución se puso en un baño de agua, y se enfrió. Después se midieron DO_{540} y DO_{600} . Se midió el número o concentración de las partículas de oro leyendo el valor de DO_{540} , que era de 2 a 4. El tamaño o la calidad de las partículas se midieron leyendo el valor de DO_{600} , que era de 0,55 a 0,75 valores. El tamaño de partícula del oro coloidal preparado era de aproximadamente 10 a 40 nm.

4.2. Preparación de conjugado de oro coloidal

Se añadió carbonato sódico monohidrato 100 mM (u otro tampón) a la solución de oro coloidal preparada, y se preparó el pH de la solución a 7,5. Después, mientras se agitaba la solución de oro coloidal se añadieron 20 μ g de albúmina de suero bovino (BSA) o 10 μ g del antígeno preS por cada 1 ml de la solución (que contenía 200 μ g de oro coloidal), y se agitó continuamente a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró, y se lavó el precipitado tres veces con un tampón de PBS esterilizado (Solución Salina Tamponada con Fosfato) para retirar BSA no unido o antígeno preS. Después, el precipitado se resuspendió en el tampón de PBS, y se almacenó a 4 °C. Se muestra una fotografía de microscopía electrónica de conjugado de oro coloidal revestido con proteína preS en la Figura 1 (JEM1010, 67,0 k). La cantidad de proteínas en el sobrenadante, que se obtuvo por centrifugación después de la adsorción de BSA o antígeno preS, se midió para cuantificar la adsorción de proteína.

Ejemplo 5. Efecto del adyuvante de oro coloidal en la inducción de la respuesta inmunitaria

5.1 Condiciones para el experimento de inmunización y procedimiento de análisis

(1) Fin: para confirmar la eficacia del conjugado de oro coloidal como un adyuvante, se analizó la respuesta inmunitaria inducida en ratones inmunizados.

(2) Material y procedimiento

(a) Animal experimental: ratones hembra de 6 semanas de edad C57BL/6.

(b) Vacuna de ensayo

El antígeno del núcleo recombinante purificado y antígeno de superficie completo se adsorbieron en alumbre para preparar una vacuna de ensayo. Se usaron 0,5 μ g de cada antígeno por dosis. Además, se mezclaron 0,5 μ g de antígeno libre, no adsorbido en alumbre con 200 μ g de conjugado de oro coloidal.

(c) Grupo de inmunización y condición de inmunización

- Grupo de inmunización

1. Grupo 1: control negativo inmunizado con PBS (solución salina tamponada con Fosfato)
2. Grupo 2: grupo inmunizado con antígeno de superficie completo recombinante y antígeno de núcleo adsorbido en alumbre
3. Grupo 3: grupo inmunizado con la mezcla de conjugados de oro coloidal y antígeno de superficie completo recombinante y antígeno de núcleo que no se adsorbieron en alumbre

- Procedimiento de administración: cada vacuna de ensayo se administró por inyección intramuscular dos veces a intervalos de dos semanas.

(d) Procedimiento de análisis de la respuesta inmunitaria

1) Análisis de la respuesta inmunitaria humoral

Se analizó la respuesta inmunitaria humoral por ELISA, como se ha descrito en el Ejemplo 3.

2) Análisis de la respuesta inmunitaria mediada por células

En un periodo de 2 semanas después de la inmunización secundaria, se tomaron los bazo de todos los ratones, y se aislaron los esplenocitos totales y se cultivaron para analizar la respuesta inmunitaria mediada por células. Los bazo separados de cada ratón se pusieron en un tamiz celular, y se trituraron. Después, los glóbulos rojos se retiraron completamente usando un tampón de lisis RBS, y se aislaron los esplenocitos. Los esplenocitos aislados se cultivaron en medio completo (glutamina 1 X y antibióticos 1 X en medio RPMI1640). Para observar las respuestas inmunitarias que eran específicas para cada antígeno, se añadió el antígeno de núcleo y antígeno de superficie completo al medio de cultivo a una concentración de 1 μ g/ml para estimular células inmunitarias específicas de antígeno. Después, la citocina (interferón g como un indicio de la respuesta inmunitaria mediada por células) secretada de la célula se analizó por un kit de ELISA (BD Biosciences).

5.2 Eficacia del conjugado de oro coloidal como adyuvante

(1) Efecto en la respuesta inmunitaria humoral

En el Grupo 2 y 3 a los que se administró antígenos de vacuna, se indujeron anticuerpo anti HBs y anticuerpo anti HBc que eran específicos para cada antígeno, en comparación con el grupo de control negativo (Grupo 1). Sin embargo, se descubrió mayor formación de anticuerpos en el caso del uso de alumbre como adyuvante (Grupo 2) que en el caso de uso de conjugado de oro coloidal como adyuvante (Grupo 3) (Figura 12). El alumbre, como se ha conocido previamente, es un adyuvante capaz de inducir una fuerte respuesta inmunitaria humoral. También se ha

descubierto que el conjugado de oro coloidal usado en la presente invención induce una respuesta inmunitaria humoral. Sin embargo, para comparar dos adyuvantes como un adyuvante para vacuna terapéutica, las respuestas inmunitarias mediadas por células inducidas por dos adyuvantes se compararon entre sí.

(2) Efecto en la respuesta inmunitaria mediada por células

5 Para confirmar si la respuesta inmunitaria mediada por células se inducía por el conjugado de oro coloidal, se separaron esplenocitos después de la inmunización secundaria de cada ratón, y se analizó la producción de interferón γ que era específica para el antígeno del núcleo o antígeno de superficie por ELISA. En el caso de usar alumbre como un adyuvante (Grupo 2), la producción de interferón γ específico de antígeno aumentó 2,5 veces más que el grupo de control no inmunizado. En el caso del uso de conjugado de oro coloidal como adyuvante, la producción de interferón γ específico de antígeno aumentó mucho más que del grupo de control no inmunizado (Figura 13), en particular, la respuesta inmunitaria mediada por células específicas de antígeno de superficie aumentó 4 veces más que en el caso de usar alumbre. Es decir, cuando el conjugado de oro coloidal se usó como adyuvante, la respuesta inmunitaria mediada por células contra el antígeno de virus de la hepatitis B se indujo eficazmente para aumentar la producción de interferón γ para eliminación del virus. En consecuencia, el conjugado de oro coloidal puede inducir fuerte respuesta inmunitaria mediada por células, usándose por lo tanto como un buen adyuvante en el desarrollo de una vacuna terapéutica eficaz.

Ejemplo 6. Optimización de la vacuna terapéutica

6.1 Condiciones para el experimento de inmunización y procedimiento de análisis

20 (1) Fin: para maximizar las respuestas inmunitarias tanto humoral como mediada por células, se compararon las composiciones óptimas de vacuna terapéutica.

(2) Materiales y procedimientos

(a) Animal experimental: ratones hembra de 6 semanas de edad C57BL/6.

(b) Vacuna de ensayo

25 El antígeno del núcleo recombinante purificado y antígeno de superficie completo se adsorbieron en alumbre. Se usaron 0,5 μ g de cada antígeno por dosis. Además, 0,5 μ g de cada antígeno adsorbido en alumbre se mezcló con 200 μ l del conjugado de oro coloidal revestido con BSA, y se realizó la inmunización.

(c) Grupo de inmunización y condición de inmunización

- Grupo de inmunización

30 Grupo 1: control negativo inmunizado con PBS.
Grupo 2: grupo inmunizado con el antígeno de superficie completo recombinante y antígeno de núcleo adsorbido en alumbre.
Grupo 3: grupo inmunizado con la mezcla de conjugados de oro coloidal, y antígeno de superficie completo recombinante y antígeno de núcleo que se adsorbieron en alumbre.

35 - Procedimiento de administración: cada vacuna de ensayo se administró por inyección intramuscular dos veces a intervalos de dos semanas.

(d) Procedimiento de análisis de la respuesta inmunitaria

Las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células inducidas por las vacunas de ensayo se analizaron de la misma manera que se ha descrito en los Ejemplos 3 y 5.

6.2 Análisis de respuestas inmunitarias inducidas

40 (1) Efecto en la respuesta inmunitaria humoral

45 Se indujo la formación de anticuerpos específicos de antígeno en los Grupos a los que se administraron antígenos de vacuna (Grupos 2 y 3), en comparación con el control negativo (Grupo 1). No hubo diferencias significativas en los títulos de anticuerpos entre el Grupo 2 (inmunizado con los antígenos adsorbidos en alumbre) y el Grupo 3 (inmunizado con la mezcla del conjugado de oro coloidal y antígenos adsorbidos en alumbre) (Figura 14). Como resultado, se mezclaron alumbre y conjugado de oro coloidal para su uso como un adyuvante, potenciando de este modo la respuesta inmunitaria humoral.

(2) Efecto en la respuesta inmunitaria mediada por células

50 Para confirmar si se indujo respuesta inmunitaria mediada por células por el conjugado de oro coloidal, se separaron los esplenocitos después de la inmunización secundaria de cada ratón, y se analizó la producción de interferón γ por ELISA.

En el Grupo 2 inmunizado con los antígenos de vacuna adsorbidos en alumbre, la producción de interferón g específico de antígeno aumentó 2 veces más que el grupo de control negativo. En el Grupo 3 inmunizado con los antígenos de vacuna y conjugado de oro coloidal, la producción de interferón g específico de antígeno del núcleo aumentó 2,5 veces, y la producción de interferón g específico de antígeno de superficie aumentó 4,5 veces (Figura 15). Por lo tanto, se ha confirmado de nuevo que el alumbre es un adyuvante capaz de inducir una fuerte respuesta inmunitaria humoral y el conjugado de oro coloidal es un adyuvante capaz de inducir una respuesta inmunitaria mediada por células fuerte, como se ha mostrado en el Ejemplo 4. En consecuencia, la inmunización se realiza usando la mezcla de antígenos de vacuna adsorbidos en alumbre y el conjugado de oro coloidal para realizar el desarrollo de una vacuna terapéutica capaz de optimizar las respuestas inmunitarias tanto humoral como mediada por células.

Ejemplo 7. Confirmación de la eficacia de la vacuna en ratón transgénico (1)

7.1 Condiciones para el experimento de inmunización y procedimiento de análisis

(1) Fin: la eficacia de la composición de vacuna terapéutica establecida en ratón normal se analizó en ratón transgénico (HBsAg/HLA-A2).

(2) Material y procedimiento

(a) Animal experimental

Se usaron ratones hembra de 6 semanas de edad transgénicos para HBsAg/HLA-A2 (Loirat D y col, HBsAg/HLA-A2 transgenic mice: a model for T cell tolerance to hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B virus infection International Immunology 15: 1125-1136, 2003). El modelo de ratón expresa continuamente antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y secreta partículas de tipo viral que consisten en antígenos de superficie a la sangre. Además, el modelo de ratón reconoce el gen del antígeno de superficie del VHB como un gen propio, y no induce la respuesta inmunitaria contra el gen, mostrando tolerancia inmunitaria. Es decir, este es un modelo de ratón para portadores crónicos del VHB, en los que la respuesta inmunitaria contra el antígeno del VHB es demasiado débil para eliminar el antígeno del virus, y se mantiene la afección de infección crónica.

(b) Antígeno de vacuna y adyuvante

El antígeno de núcleo recombinante purificado y antígeno de superficie recombinante completo se adsorbieron en alumbre para usar como un antígeno de vacuna. El conjugado de oro coloidal revestido con BSA se usó como un adyuvante para vacuna terapéutica.

(c) Grupo de inmunización y condición de inmunización

- Grupo de inmunización

1. Grupo 1: control negativo inmunizado con PBS (solución salina tamponada con Fosfato)
2. Grupo 2: grupo inmunizado con el antígeno de superficie completo recombinante y antígeno del núcleo adsorbido en alumbre
3. Grupo 3: grupo inmunizado con la mezcla de conjugados de oro coloidal, y antígeno de superficie completo recombinante y antígeno del núcleo que se adsorbieron en alumbre.

- Procedimiento de administración: cada vacuna de ensayo se administró por inyección intramuscular tres veces a intervalos de dos semanas.

(d) Análisis de partícula de tipo viral en el suero

Se recogieron sueros preinmunitarios y sueros después de la inmunización terciaria, y se analizó la cantidad de partículas de tipo viral que consistían en el antígeno de superficie (HBsAg) en el suero usando un kit de ELISA HBsAg Genedia 3.0 (GREEN CROSS).

(e) Análisis de la respuesta inmunitaria humoral

Se recogieron sueros preinmunitarios y sueros después de la inmunización terciaria, y se analizó la formación de anticuerpos específicos de antígeno de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 4. Además, se determinó el subtipo de anticuerpo inducido para medir la relación de IgG2a e IgG1.

(f) Análisis de respuesta inmunitaria mediada por células

Se separaron esplenocitos y se cultivaron por el procedimiento como se ha descrito en el Ejemplo 4, y se analizó la inducción de interferón g como un indicio de respuesta inmunitaria mediada por células por ensayo de ELISA ELISPOT.

(g) Análisis de interferón g y expresión del gen del antígeno de superficie en el hígado

Se extrajo ARN total del hígado de ratón, y se analizó la expresión génica por un procedimiento de RT-PCR. Se aisló el ARN total usando un kit RNeasy Mini (Qiagen) y se analizaron la expresión del gen de antígeno de superficie (SEC ID N° 9 y 10) y gen de interferón g (SEC ID N° 11 y 12) usando los siguientes cebadores y un kit de RT-PCR de una etapa (Qiagen). Se usó la expresión del gen de β actina (SEC ID N° 13 y 14) como un control negativo.

S-(F) 5'-ATG GAG AGC ACA ACA TCA GG-3' (SEC ID N°: 9)
 S-(R) 5'-TTA AAT GTA TAC CCT AAG-3' (SEC ID N°: 10)
 INF- γ (F) 5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3' (SEC ID N°: 11)
 INF- γ (R) 5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3' (SEC ID N°: 12)
 β actina (F) 5'-TCC TGT GGC ATC CAT GAA AC-3' (SEC ID N°: 13)
 β actina (R) 5'-CTT CGT GAA CGC CAC GTG C-3' (SEC ID N°: 14)

7.2 Eficacia del conjugado de oro coloidal como adyuvante para vacuna terapéutica

1) Interrupción de la tolerancia inmunitaria

El modelo de ratón transgénico reconoce el antígeno de superficie del VHB como un antígeno propio para no inducir respuesta inmunitaria contra el antígeno, mostrando tolerancia inmunitaria. Sin embargo, cuando se administró al modelo de ratón la vacuna terapéutica, la tolerancia inmunitaria al antígeno de superficie se interrumpió para inducir respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células.

a) Inducción de respuesta inmunitaria humoral

El título de anticuerpo contra el antígeno de superficie se determinó usando el suero preinmunitario y suero después de la inmunización terciaria. Incluso aunque se mantuvo la alta concentración de antígeno en sangre en el control negativo (Grupo 1), no se detectó anticuerpo contra el antígeno de superficie. Sin embargo, en el grupo al que se administró el antígeno de vacuna (Grupos 2 y 3), se interrumpió la tolerancia inmunitaria al antígeno de superficie, y se produjo el anticuerpo contra el antígeno de superficie. En el caso de usar el conjugado de oro coloidal revestido con BSA como un adyuvante (Grupo 3), la producción del anticuerpo inducido fue ligeramente menor, en comparación con el grupo al que se administró el antígeno de vacuna adsorbido en alumbre (Grupo 2) (Figura 16). Sin embargo, se descubrió que la relación de IgG2a e IgG1 era mayor en el Grupo 3 usando el conjugado de oro coloidal como un adyuvante que en el Grupo 2 usando alumbre solamente (Figura 17). En consecuencia, puede verse que el conjugado de oro coloidal como un adyuvante desviaba la respuesta inmunitaria hacia respuesta de Th1.

(b) Inducción de la respuesta inmunitaria mediada por células

Se ha sabido que la respuesta inmunitaria mediada por células fuerte es esencial para la eliminación del virus. Por lo tanto, para confirmar si la vacuna terapéutica interrumpe la tolerancia inmunitaria e induce la respuesta inmunitaria mediada por células específica de antígeno de superficie, se separaron esplenocitos después de la inmunización para comparar la producción de interferón g como un indicio de la respuesta inmunitaria mediada por células por ELISPOT y ELISA. En el experimento que usa los ratones transgénicos, también se indujo una respuesta inmunitaria mediada por células mayor en el Grupo 3 usando el conjugado de oro coloidal como un adyuvante (A y B en la Figura 18), que es similar a los resultados en el Ejemplo 5.

2) Reducción de la partícula de tipo viral que consiste en el antígeno de superficie (HBsAg) en sangre

El suero preinmunitario y suero después de la inmunización terciaria se recogieron para analizar la cantidad de partículas de tipo viral que consistían en el antígeno de superficie (HBsAg) en sangre. Como se ha indicado previamente, la cantidad de partícula de tipo viral en sangre se redujo de forma natural en aproximadamente el 40 % en el control negativo. Sin embargo, las cantidades de partícula de tipo viral en sangre se redujeron significativamente en grupos inmunizados con la vacuna terapéutica. Además, después de la inmunización terciaria, se detectó la menor cantidad de partícula de tipo viral en el Grupo 3 inmunizado con la mezcla de los antígenos de vacuna y conjugado de oro coloidal, en comparación con el Grupo 2 inmunizado solamente con los antígenos de vacuna adsorbidos en alumbre (Figura 19). En el Grupo 2 inmunizado solamente con los antígenos de vacuna adsorbidos en alumbre, se descubrió que la cantidad de antígeno se reducía temporalmente, sin embargo, no se indujo la respuesta inmunitaria mediada por células. Por lo tanto, no se pensó que eliminara completamente el virus.

3) Reducción de la expresión del gen viral en hígado por respuesta inmunitaria mediada por células

Para eliminar el virus de los hepatocitos infectados, las células inmunitarias que secretan interferón g y que tienen actividad citolítica tienen que emigrar al hígado para suprimir la transcripción del gen viral y destruir directamente las células infectadas. Por lo tanto, para confirmar si la respuesta inmunitaria mediada por células específica de antígeno se induce de hecho en el hígado del ratón transgénico, se extrajo ARN total del hígado de ratón, y se analizó la expresión del interferón g por el procedimiento de RT-PCR. Se descubrió que la expresión del interferón g era baja en el grupo de control (Grupo 1) y Grupo 2, mientras que se descubrió que la expresión del interferón g era

de 3 a 4 veces mayor en el Grupo 3 (Figura 20). Además, para confirmar si el interferón g producido suprime la expresión del gen viral, es decir, gen de antígeno de superficie del VHB en hepatocitos, se realizó el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente para comparar la expresión del gen de antígeno de superficie. Se descubrió que el nivel de expresión alto del antígeno de superficie se mantenía en el grupo de control (Grupo 1) y Grupo 2 inmunizado solamente con los antígenos adsorbidos en alumbre. Por el contrario, se descubrió que la expresión del antígeno de superficie se reducía notablemente en el Grupo 3 (Figura 20).

En consecuencia, puede verse que la vacuna terapéutica de la presente invención interrumpe la tolerancia inmunitaria al antígeno del virus de la hepatitis B, e induce respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células. En particular, se ha descubierto que el oro coloidal como un adyuvante inducía respuesta inmunitaria mediada por células fuerte para suprimir la expresión del gen viral en hepatocitos y eliminar partículas de tipo viral de la sangre. En consecuencia, estos experimentos demostraron que la vacuna terapéutica que contenía oro coloidal como un adyuvante de la presente invención detiene la tolerancia inmunitaria para inducir respuestas inmunitarias específicas de antígeno, y por lo tanto es buena para resolver infección crónica.

Ejemplo 8. Confirmación de la eficacia de la vacuna en ratón transgénico (2)

8.1 Condiciones para el experimento de inmunización y procedimiento de análisis

Se usó un conjugado de oro coloidal revestido con una parte de antígeno de superficie del VHB, proteína pres, como un adyuvante para vacuna terapéutica. Los animales experimentales, grupos de inmunización y procedimientos de análisis fueron iguales que los descritos en el Ejemplo 7.

8.2 Eficacia del conjugado de oro coloidal revestido con preS como adyuvante para vacuna terapéutica

1) Interrupción de la tolerancia inmunitaria

En el caso de uso del conjugado de oro coloidal revestido con preS como un adyuvante para vacuna terapéutica, la tolerancia inmunitaria se detuvo para inducir respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales, como se muestra en el Ejemplo 6 (usando conjugado de oro coloidal revestido con BSA).

a) Inducción de respuesta inmunitaria humoral

El título de anticuerpo contra el antígeno de superficie se determinó usando los sueros preinmunitarios y sueros después de la inmunización terciaria. Incluso aunque la alta concentración de antígeno en sangre se mantuvo en el control negativo (Grupo 1), no se detectó ningún anticuerpo contra el antígeno de superficie. Sin embargo, en el grupo al que se administró el antígeno de vacuna (Grupo 2 y 3), se interrumpió la tolerancia inmunitaria al antígeno de superficie, y se produjo el anticuerpo contra el antígeno de superficie. En el caso de usar el conjugado de oro coloidal revestido con BSA como un adyuvante (Grupo 3), la producción del anticuerpo inducido fue ligeramente menor, en comparación con el grupo al que se administró el antígeno de vacuna adsorbido en alumbre (Grupo 2) (Figura 21). Sin embargo, se descubrió que la relación de IgG2a e IgG1 era mayor en el Grupo 3 usando el conjugado de oro coloidal como un adyuvante que en el Grupo 2 usando solamente alumbre (Figura 22). En consecuencia, puede verse que el conjugado de oro coloidal como un adyuvante desviaba la respuesta inmunitaria hacia respuesta de Th1.

(b) Inducción de la respuesta inmunitaria mediada por células

Se ha sabido que la respuesta inmunitaria mediada por células fuerte es esencial para la eliminación del virus. Por lo tanto, para confirmar si la vacuna terapéutica interrumpe la tolerancia inmunitaria e induce la respuesta inmunitaria mediada por células específica de antígeno de superficie, se separaron esplenocitos después de la inmunización para comparar la producción de interferón g como un indicio de la respuesta inmunitaria mediada por células por ELISPOT y ELISA. En el experimento que usa los ratones transgénicos, también se indujo mayor respuesta inmunitaria mediada por células en el Grupo 3 usando el conjugado de oro coloidal como un adyuvante (A y B en la Figura 23), que es similar a los resultados en el Ejemplo 5.

2) Reducción de la partícula de tipo viral que consiste en el antígeno de superficie (HBsAg) en sangre

Los sueros preinmunitarios y sueros después de la inmunización terciaria se recogieron para analizar la cantidad de partícula de tipo viral que consiste en el antígeno de superficie (HBsAg) en sangre. Como se ha indicado previamente, la cantidad de partícula de tipo viral en sangre se redujo de forma natural en el control negativo. Sin embargo, las cantidades de partícula de tipo viral en sangre se redujeron significativamente en grupos inmunizados con la vacuna terapéutica. Además, después de la inmunización terciaria, se detectó la menor cantidad de partícula de tipo viral en el Grupo 3 inmunizado con la mezcla de los antígenos de vacuna y conjugado de oro coloidal, en comparación con el Grupo 2 inmunizado solamente con los antígenos de vacuna adsorbidos en alumbre (Figura 24). En el Grupo 2 inmunizado solamente con los antígenos de vacuna adsorbidos en alumbre, se descubrió que la cantidad de antígeno se reducía temporalmente, sin embargo, no se indujo la respuesta inmunitaria mediada por células. Por lo tanto, no se pensó que eliminara completamente el virus.

Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona una vacuna del VHB que comprende un antígeno de superficie de hepatitis B completo que consiste en los antígenos preS1, preS2 y S (L-HBsAg), y una vacuna multi antígeno del VHB que comprende el antígeno de superficie completo y un antígeno del núcleo recombinante. La vacuna comprende además oro coloidal como un adyuvante para inducir la respuesta inmunitaria mediada por células fuerte, usándose de este modo como una vacuna terapéutica para virus de la hepatitis B.

5

<110> DOBEEL Corporation

10

<120> Una vacuna del VHB y un procedimiento para prepararla

<130> OPA07056/PCT

15

<150> KR10-2007-0010167

<151> 31-01-2007

<160> 14

20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2782

<212> ADN

25

<213> Gen de la envoltura del virus de la hepatitis B

<400> 1

ES 2 526 744 T3

agatctcaat ctogggaaatc tcaatgtag tatccottgg actcataagg tgggaaactt	60
tactgggctt tattctteta ctgtacctgt ctttaatcct gagtggcaaa ctccctcctt	120
tcctaacatt catttacagg aggacattat taatagatgt caacaatatg tgggccctct	180
tacagttaat gaaaaaagga gattaaaatt aattatgect gctaggtttt atcctaacct	240
taccaaatat ttgccottgg ataaaggcat taaaccttat tatcctgaac atgcagttaa	300
tcattacttc aaaactaggc attatttaca tactctgtgg aaggctggca ttctatataa	360
gagagaaact acacgcagcg cttcattttg tgggtcacca tattcttggg aacaagagct	420
acagcatggg aggttggctt tccaaacctc gacaaggcat ggggacgaat ctttctgttc	480
ccaatcctct gggattcttt cccgatcacc agttggaccc tgcgttcgga gccaaactcaa	540
acaatccaga ttgggacttc aacccaaca aggatcactg gccagaggca aatcaggtag	600
gagtgggagc attcgggcca gggttcacc caccacacgg cggctttttg gggtagagcc	660
ctcaggctca gggcatattg acaacagtgc cagcagcgc tctcctgcc tccaccaatc	720
ggcagtcagg aagacagcct actcccatct ctccacctct aagagacagt catcctcagg	780
ccatgcagtg gaactccacc acattccacc aagctctgct agatcccaga gtgaggggccc	840
tatattttcc tgctgggtgc tccagttccg gaacagtaaa ccctgttccg actactgcct	900
cacccatatc gtcaatcttc tgcaggactg gggaccctgc accgaacatg gagagcacia	960
catcaggatt cctaggaccc ctgctcgtgt tacaggcggg gtttttcttg ttgacaagaa	1020
tctcacaat accacagagt ctgactcgt ggtggacttc tctcaatctt ctagggggag	1080
caccacgtg tctggccaa aattcgcagt ccccaacctc caatcactca ccaacctctt	1140
gtctccaat ttgtcctggc tatcgtcga tgtgtctgcg gcgttttatc atattcctct	1200
tcctcctgct gctatgcctc atcttctgt tggttctctt ggactaccaa ggtatgttgc	1260
ccgtttgtcc tctacttcca ggaacatcaa ctaccagcac gggaccatgc aagacctgca	1320
cgattcctgc tcaaggaacc tctatgttcc cctcttgttg ctgtacaaaa ccttcggacg	1380

ES 2 526 744 T3

gaaactgcac ttgtattccc atccocatcat cctgggcttt cgcaagattc ctatgggagt 1440
 gggcctcagt ccgtttctcc tggctcagtt tactagtgcc atttgttcag tggttcgcag 1500
 ggctttcccc cactgtttgg ctttcagtta tatggatgat gtggatttgg gggccaagtc 1560
 tgtacaacat cttgagtcce tttttacctc tattaccaat tttcttctgt ctttgggtat 1620
 acatTTaaac cctaataaaa ccaagcgttg gggctactcc cttaacttca tgggatatgt 1680
 aattggaagc tggggctactt taccacagga acatattgta ctaaagctca aggaatgttt 1740
 tcggaaactg cctgtaaata gacctattga ttggaaagta tgtcaaagaa ttgtgggtct 1800
 tttgggcttt gctgcccctt ttacacaatg tggctatcct gccttgatgc ctttatatgc 1860
 atgtatacaa gctaagcagg ctttccacttt ttgcgcaact tacaaggcct ttctgtgtaa 1920
 acaatatctg cacctttacc ccgttgcccg gcaacgggtca ggtctctgcc aagtgtttgc 1980
 tgacgcaacc cccactggat ggggcttggc cataggccat cggcgcagtc gtggaacctt 2040
 tgtggctcct ctgcogatcc ataactgcgga actcctagca gcgtgttttg ctogcagcag 2100
 gtctggagca acacttatcg ggactgacaa ctctgttctc ctctctcgga aatacacctc 2160
 cttcccatgg ctgctcggat gtgctgcaa ctggatcctg cgcgggacgt cctttgtcta 2220
 cgtcccgctg gcgctgaatc ccgcccagca cccgtctcgg ggccggttgg gcctctaccg 2280
 tccccttctt catctgccgt tccggccgac cacggggcgc acctctcttt acgcccgtctc 2340
 cccgtctgtg ccttctcctc taccggaccg tgtgcacttc gcttcacctc tgcacgtcgc 2400
 atggagacca ccgtgaacgc ccaccaggtc ttgcccaagg tottacataa gaggactctt 2460
 ggactctcag caatgtcaac gaccgacctt gaggcatact tcaaagactg tttgtttaa 2520
 gactgggagg agttggggga ggagattagg ttaaaggctc ttgtactagg aggctgtagg 2580
 cataaattgg tctgtgcacc agcaccatgc aactttttca cctctgccta atcatctcat 2640
 gttcatgtcc tactgttcaa gcctccaagc tgtgccttgg gtggcttgg ggcattggaca 2700
 ttgaccgta taaagaattt ggagcttctg tggagttact ctcttttttg ccttctgact 2760
 totttccttc tattogagat ct 2782

- 5 <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador directo para PCR

- <400> 2
- ggaagatctc aatctcggga a 21

- 15 <210> 3
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador inverso para PCR

ES 2 526 744 T3

<400> 3
ggaagatctc gaatagaagg aaag 24

5 <210> 4
<211> 400
<212> PRT
<213> L-HBsAg del virus de la hepatitis B

10 <400> 4

```

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
 1           5           10           15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
          20           25           30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
          35           40           45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe Gly
 50           55           60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln
 65           70           75           80

Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser
          85           90           95

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu
          100          105          110

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His
          115          120          125

Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly
          130          135          140

Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro
145          150          155          160

Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu
          165          170          175

Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly
          180          185          190

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser
          195          200          205

Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly
          210          215          220

Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro
225          230          235          240

Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile
          245          250          255

Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu

```


ES 2 526 744 T3

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala
 65 70 75 80
 Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
 85 90 95
 Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 100 105 110
 Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125
 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140
 Glu Thr Thr Val Val
 145

<210> 6
 <211> 447
 5 <212> ADN
 <213> Ácido nucleico que codifica un antígeno del núcleo del VHB excepto el grupo de arginina en el extremo C-terminal

10 <400> 6
 atggacattg acccgtataa agaatttgga gcttctgtgg agttactctc ttttttgcct 60
 tctgacttct ttccttctat tcgagatctc ctgcacaccg cctctgctct gtatcgggag 120
 gccttagagt ctccggaaca ttgttcacct caccatacag cactcaggca agctattctg 180
 tgttgggggtg agttgatgaa tctggccacc tgggtgggaa gtaatttgga agaccagca 240
 tccaggggat tagtagtcag ctatgtcaac gttaatatgg gcctaaaaat cagacaacta 300
 ttgtggtttc acatttctg tcttactttt ggaagagaaa ctggttcttga gtatttgggtg 360
 tcttttggag tgtggattcg cactcctccc gcttacagac caccaaatgc ccctatctta 420
 tcaacacttc cggaaactac tgttggt 447

15 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador directo para PCR

<400> 7
 ccccatatgg acattgacc gta 23

5
 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Cebador inverso para PCR

<400> 8
 cgcgatcca acaacagtag ttccgg 27

15
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Cebador directo para RT-PCR

<400> 9
 atggagagca caacacagg 20

25
 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Cebador inverso para RT-PCR

<400> 10
 ttaatgtat accctaag 18

35
 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Cebador directo para RT-PCR

45
 <400> 11
 agcggctgac tgaactcaga ttgtag 26

50
 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Cebador inverso para RT-PCR

<400> 12
 gtcacagttt tcagctgtat aggg 24

60
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <223> Cebador directo para RT-PCR

ES 2 526 744 T3

<400> 13
tcctgtggca tccatgaaac 20

5
<210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

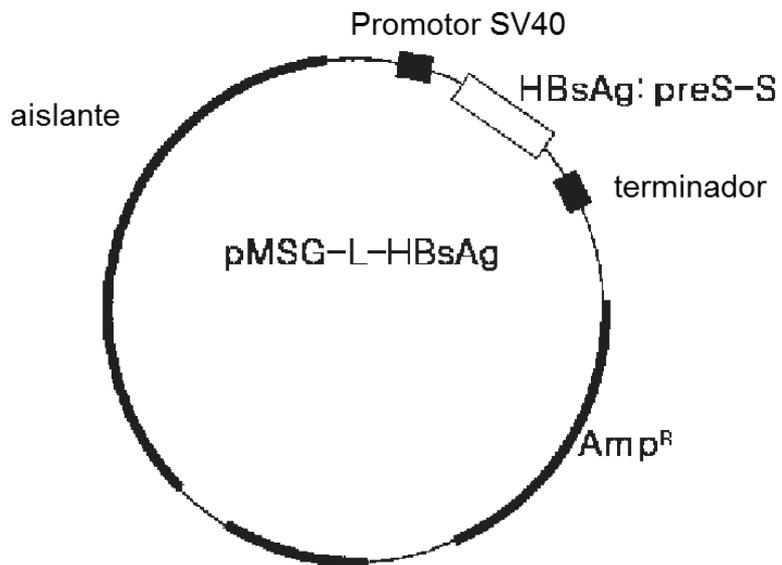
10
<220>
<223> Cebador inverso para RT-PCR

<400> 14
cttcgtgaac gccacgtgc 19

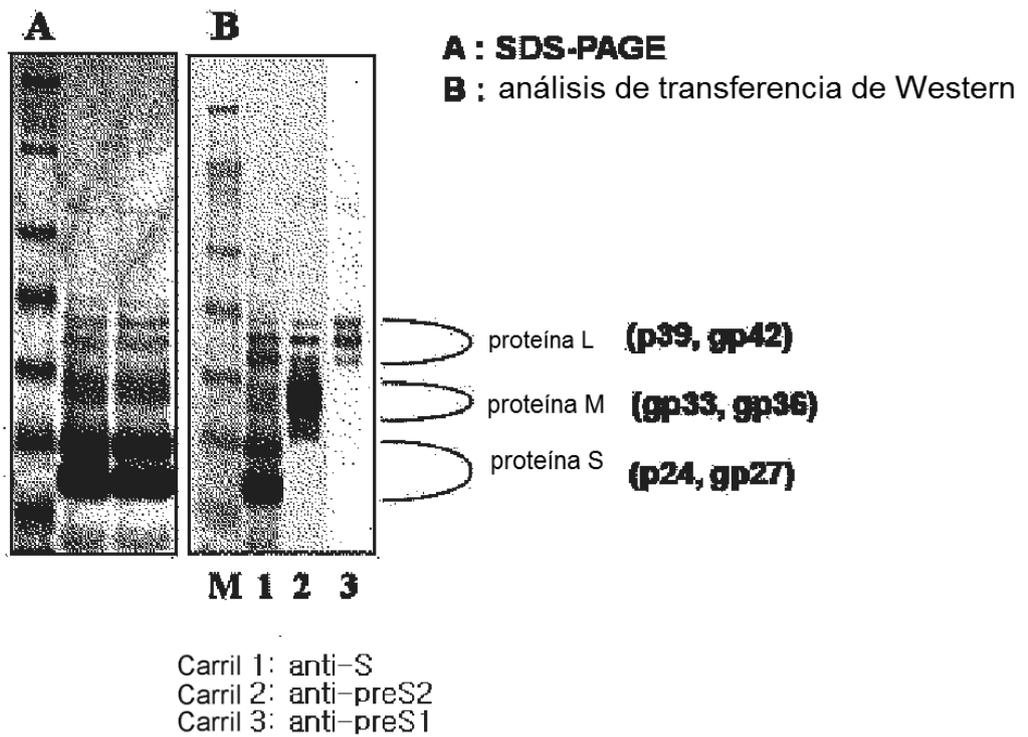
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna del VHB que comprende un antígeno de superficie del VHB completo recombinante (L-HBsAg) y antígeno del núcleo del VHB, en la que el antígeno de superficie completo consiste en tres tipos de proteína de superficie (proteína L, proteína M y proteína S) y los antígenos preS producidos que consisten en preS1 y preS2 se localizan en la superficie externa de partículas formadas por enlaces entre antígenos S, y en la que la vacuna comprende alumbre y oro coloidal como un adyuvante.
- 10 2. La vacuna del VHB de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno del núcleo del VHB es obtenido cultivando *E. coli* transformadas con un vector de expresión recombinante que comprende un nucleótido que codifica el antígeno del núcleo del VHB, en el que preferentemente el nucleótido que codifica el antígeno del núcleo de VHB tiene una secuencia de bases de SEC ID N°: 6.
3. Un procedimiento para preparar la vacuna del VHB de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 15 1) introducir un polinucleótido que tiene una región codificante para el gen de la envoltura del VHB completo y un nucleótido 3'-UTR completo que contiene un sitio de poliadenilación en un vector pSGM depositado con el número de referencia: KCCM 10202;
- 2) transformar una célula animal con el vector de expresión de la etapa 1); y
- 3) cultivar la célula animal transformada para recuperar una proteína de antígeno de superficie completo del VHB recombinante (L-HBsAg);
- 20 4) introducir un polinucleótido que codifica un antígeno del núcleo del VHB en un vector de expresión;
- 5) transformar una célula huésped con el vector de expresión de la etapa 4);
- 6) cultivar la célula huésped transformada para recuperar una proteína del núcleo del VHB recombinante; y
- 7) mezclar el antígeno de superficie completo del VHB obtenido en la etapa 3) y la proteína del antígeno del núcleo del VHB obtenida en la etapa 6) con alumbre y oro coloidal como un adyuvante.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el polinucleótido de la etapa 1) tiene una secuencias de bases de SEC ID N°: 1 y/o la célula animal es una célula CHO.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la célula animal transformada de la etapa 3) es un transformante depositado con el número de referencia KCTC 11058BP.
- 30 6. La vacuna del VHB de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína L, proteína M y proteína S son coexpresadas de un vector de expresión, en la que el vector de expresión es preparado insertando una región codificante para gen de la envoltura del VHB completo y un nucleótido 3'-UTR completo que contiene un sitio de poliadenilación en un vector pSGM depositado con el número de referencia KCCM 10202.
7. La vacuna del VHB de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la región codificante para el gen de la envoltura del VHB y nucleótido 3'-UTR completo que contiene un sitio de poliadenilación tiene una secuencia de bases de SEC ID N°: 1.

[Fig. 1]

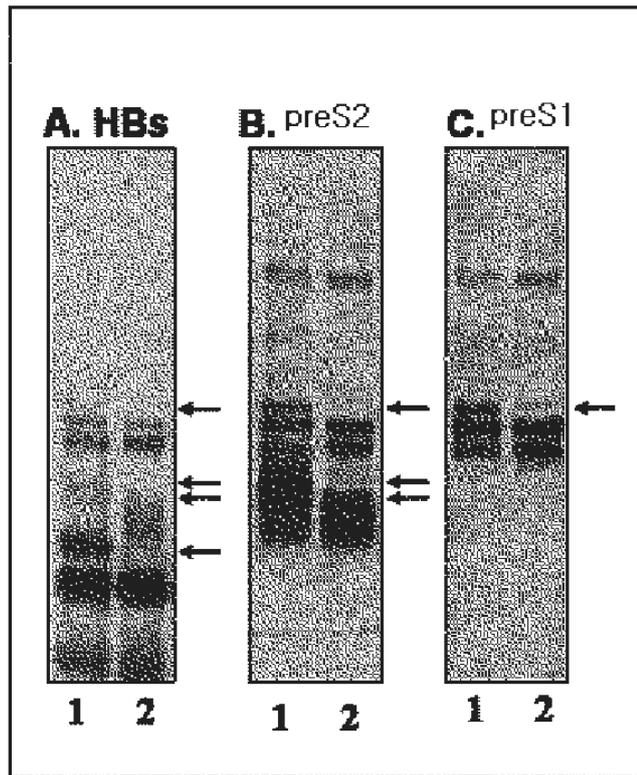


[Fig. 2]



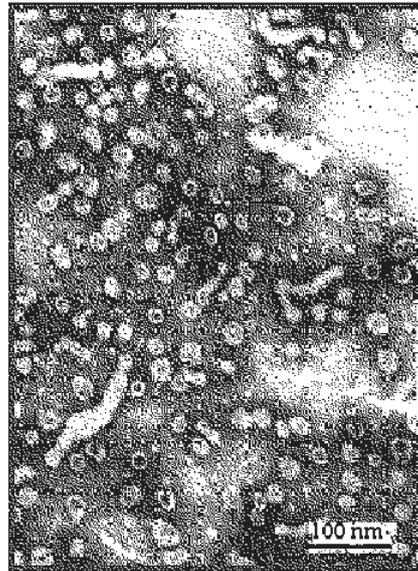
[Fig. 3]

- A. Transferencia de Western con anticuerpo anti-S
- B. Transferencia de Western con anticuerpo anti-preS2
- C. Transferencia de Western con anticuerpo anti-preS1



Carril 1: proteína de superficie completa (antes de tratamiento con N-glucosidasa F)
Carril 2: proteína de superficie completa (después de tratamiento con N-glucosidasa F)

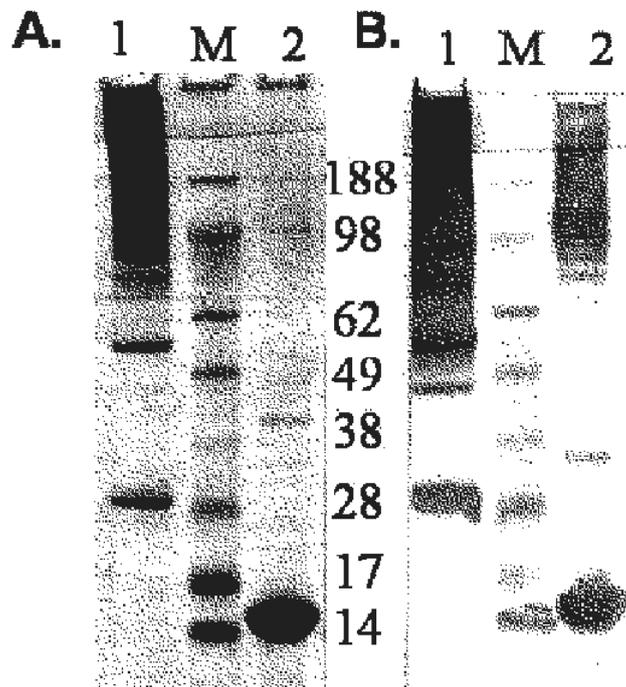
[Fig. 4]



[Fig. 5]

A : SDS-PAGE

B : análisis de transferencia de Western

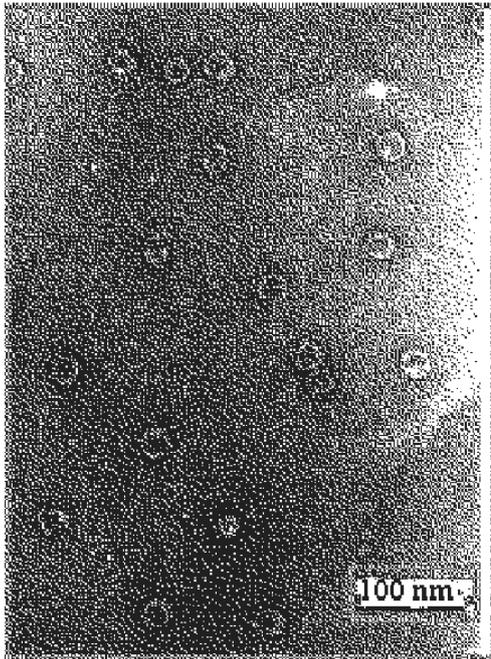


M. Marcador

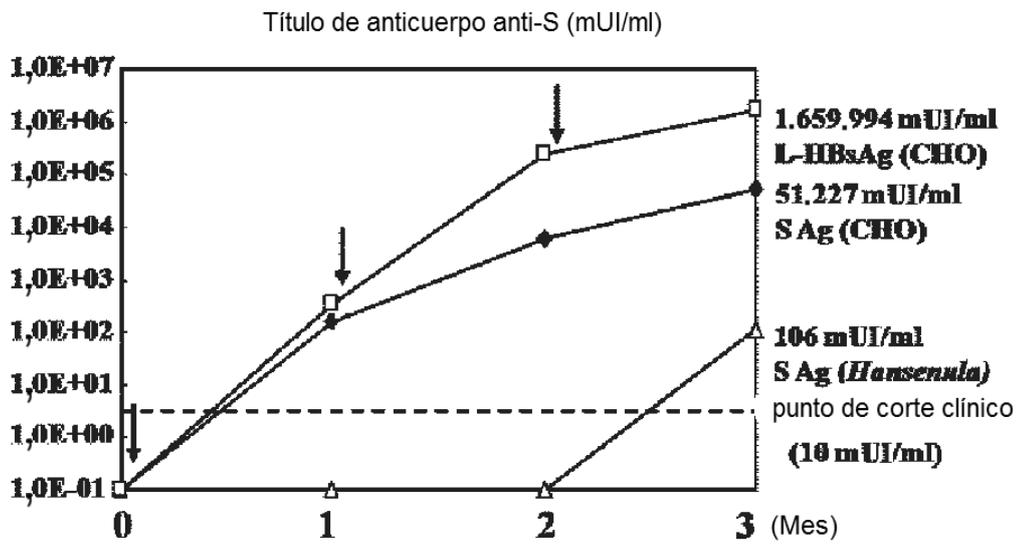
Carril 1. Condición no reducida

Carril 2. Condición reducida

[Fig. 6]



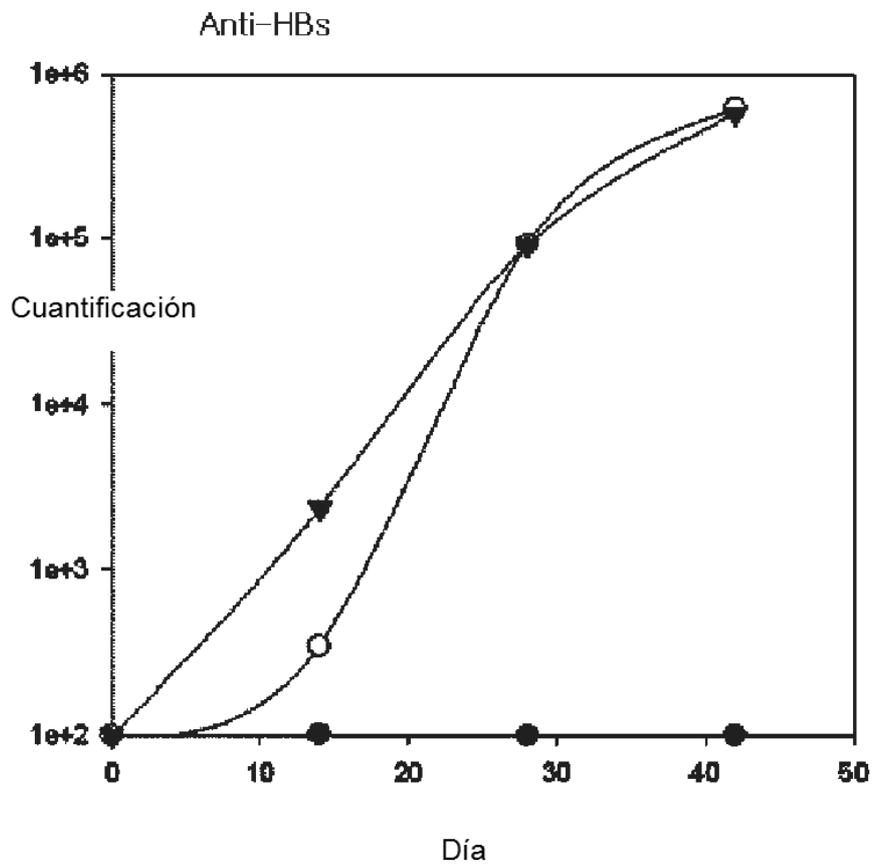
[Fig. 7]



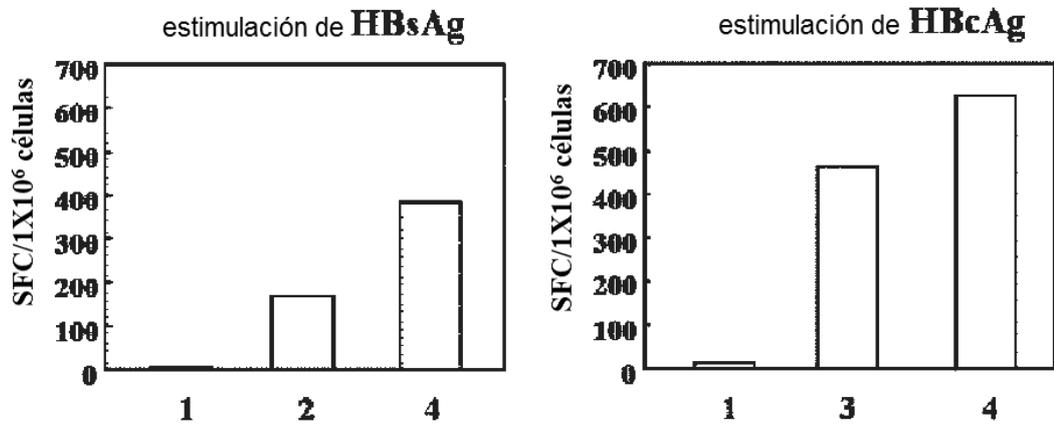
[Fig. 8]

Grupo	Antígeno (huésped)	Cantidad de antígeno a DE50
Grupo 1	S Ag (levadura)	1,41 µg
Grupo 2	S Ag (CHO)	0,469 µg
Grupo 3	L-HBsAg (CHO)	<0,156 µg

[Fig. 9]

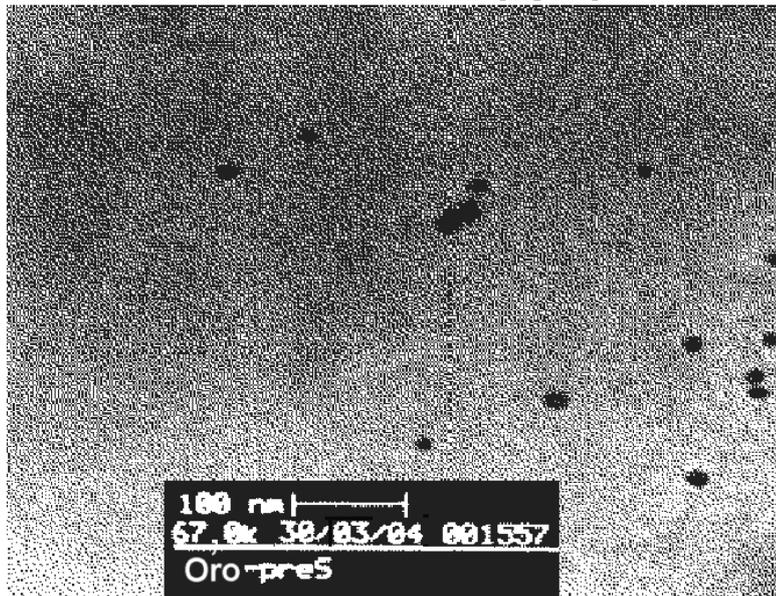


[Fig. 10]

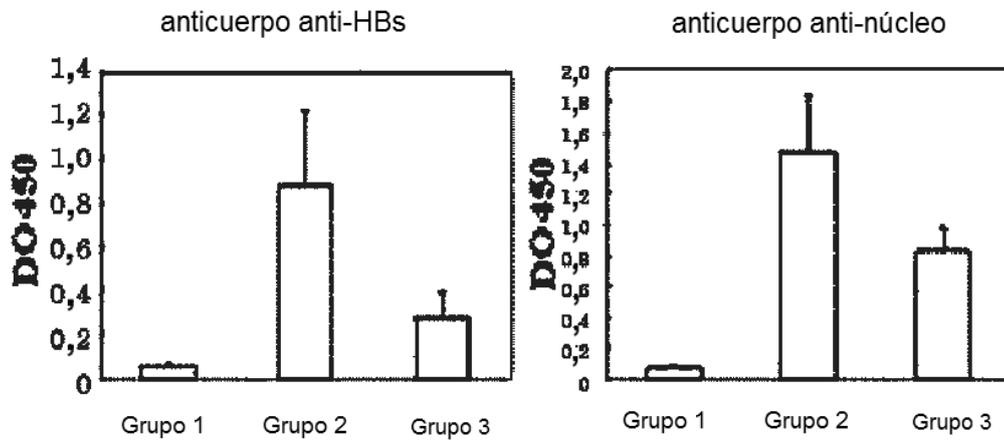


- 1 : Control de PBS
- 2 : L-HBsAg adsorbido en alumbre
- 3 : HBcAg adsorbido en alumbre
- 4 : L-HBsAg + HBcAg adsorbidos en alumbre

[Fig. 11]

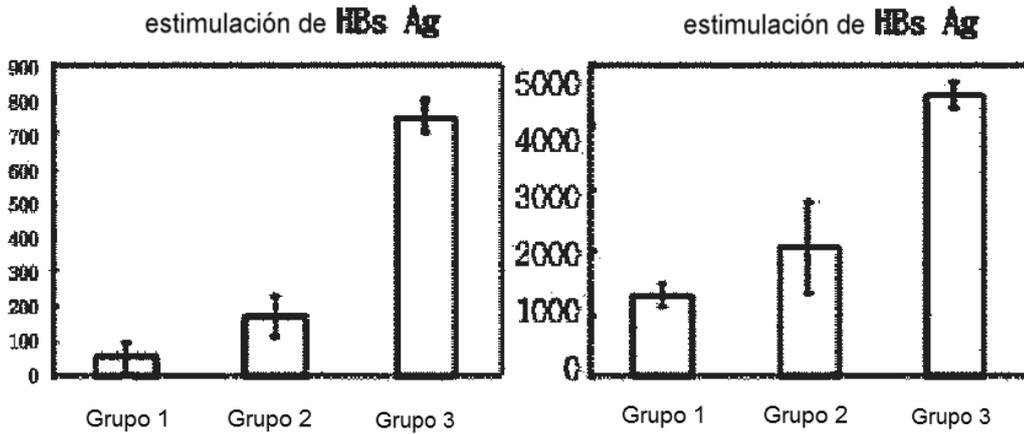


[Fig. 12]

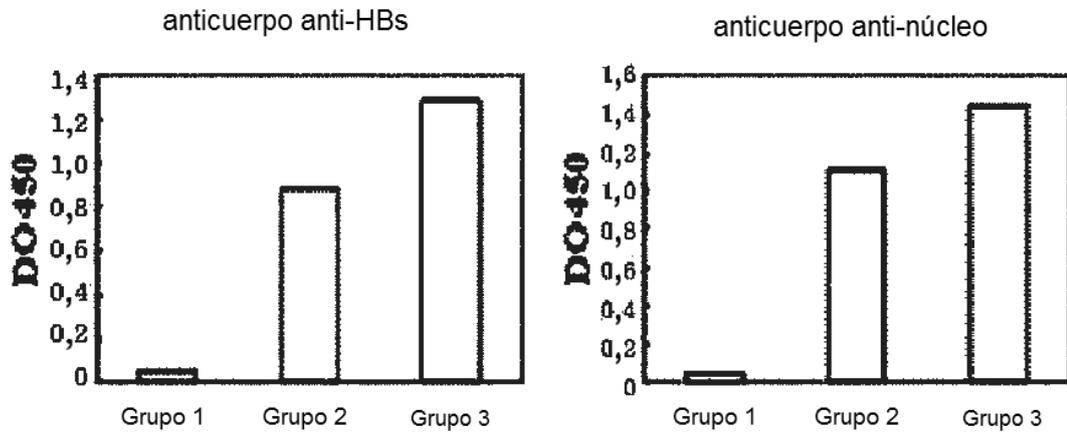


[Fig. 13]

INF- τ (pg/ml)

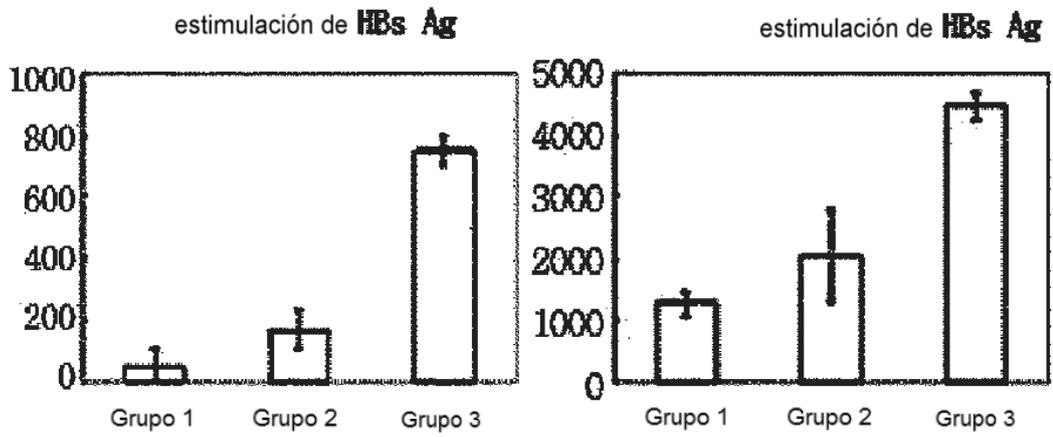


[Fig. 14]



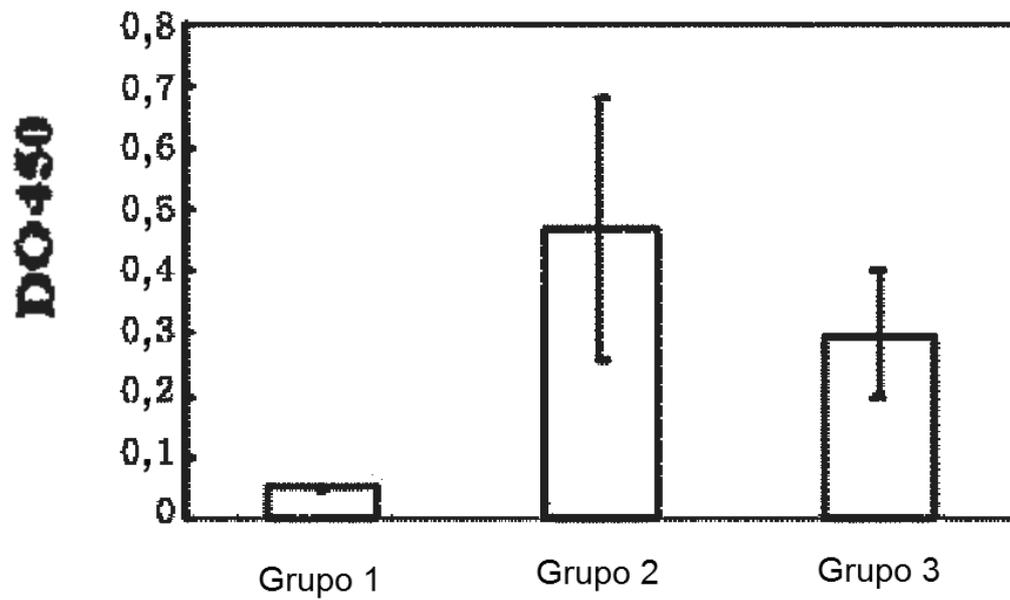
[Fig. 15]

INF-r (pg/ml)



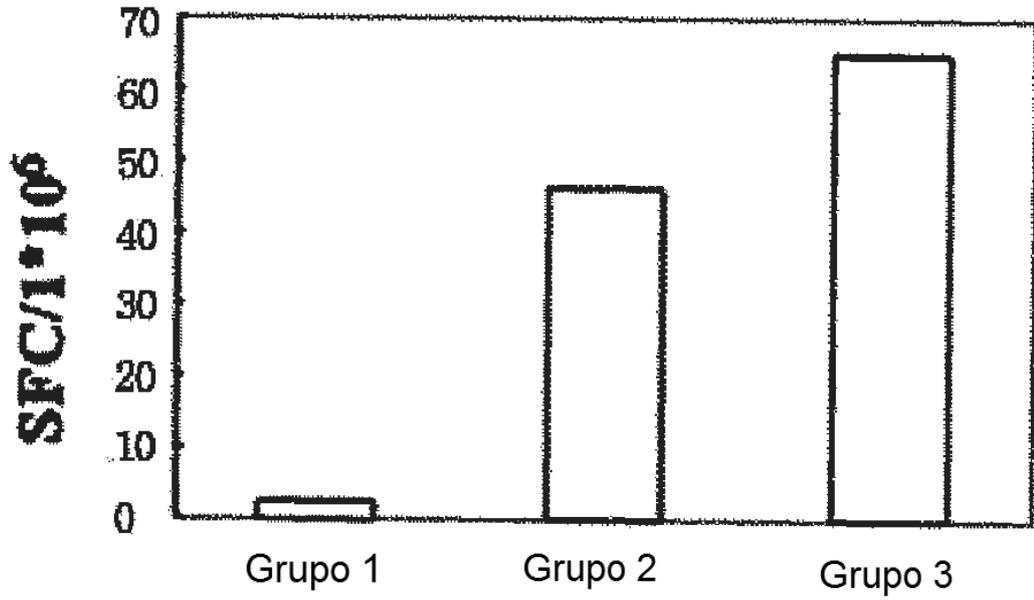
[Fig. 16]

anticuerpo anti-HBs

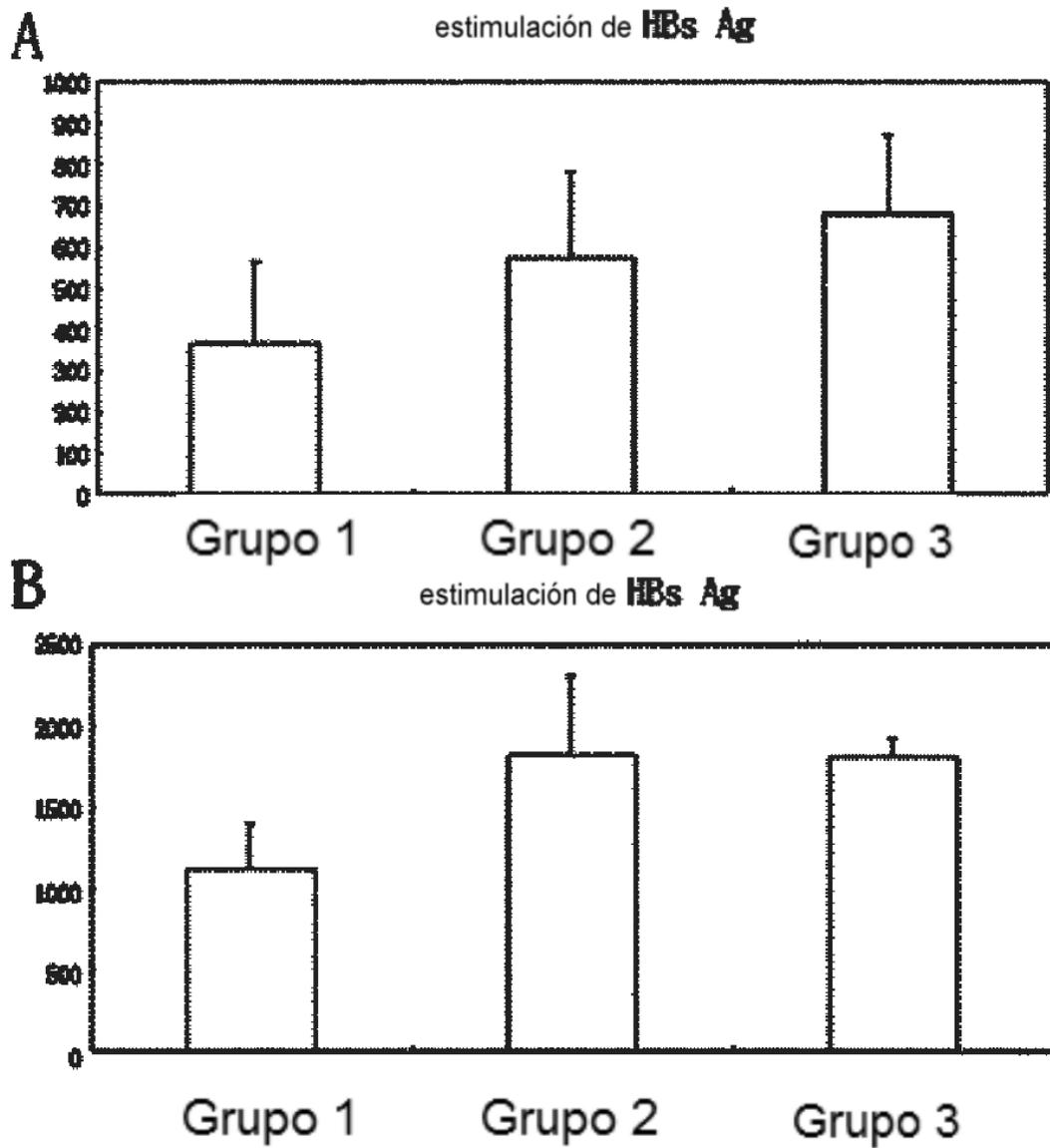


[Fig. 17]

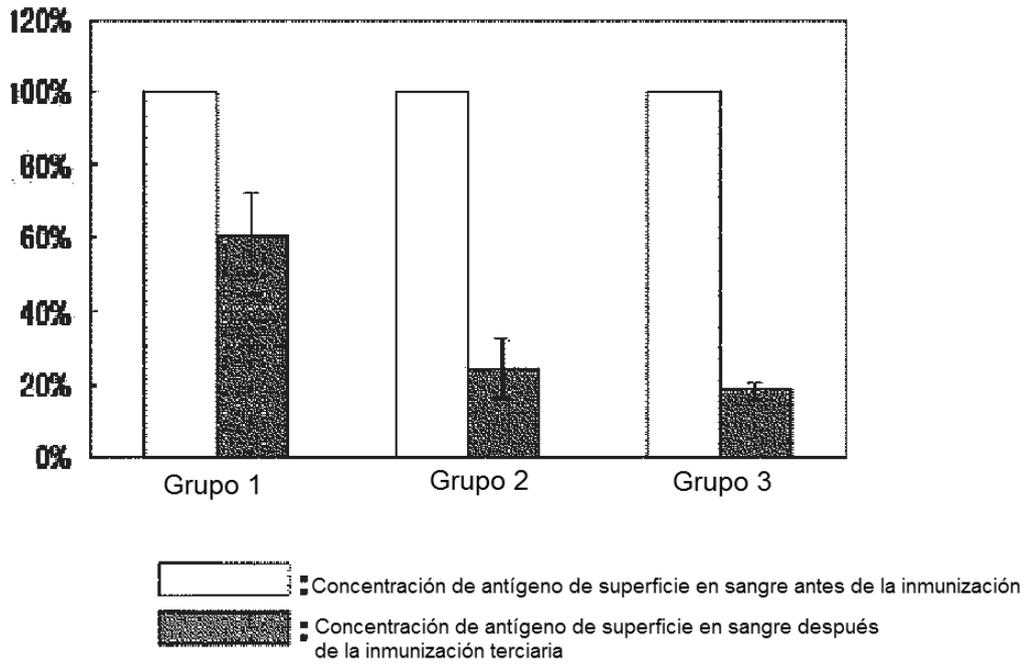
ensayo de **ELISPOT**



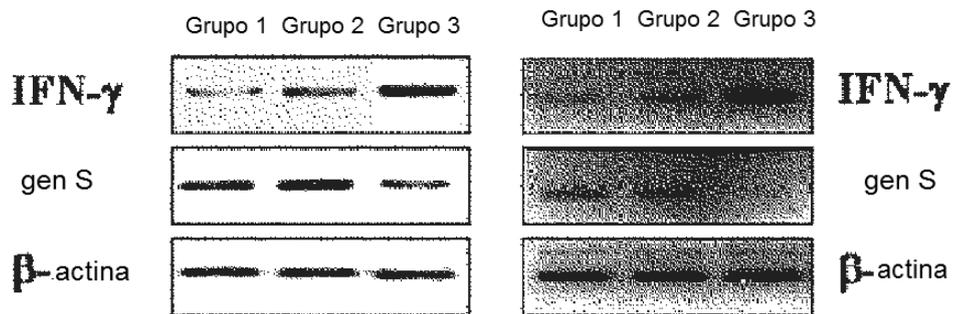
[Fig. 18]



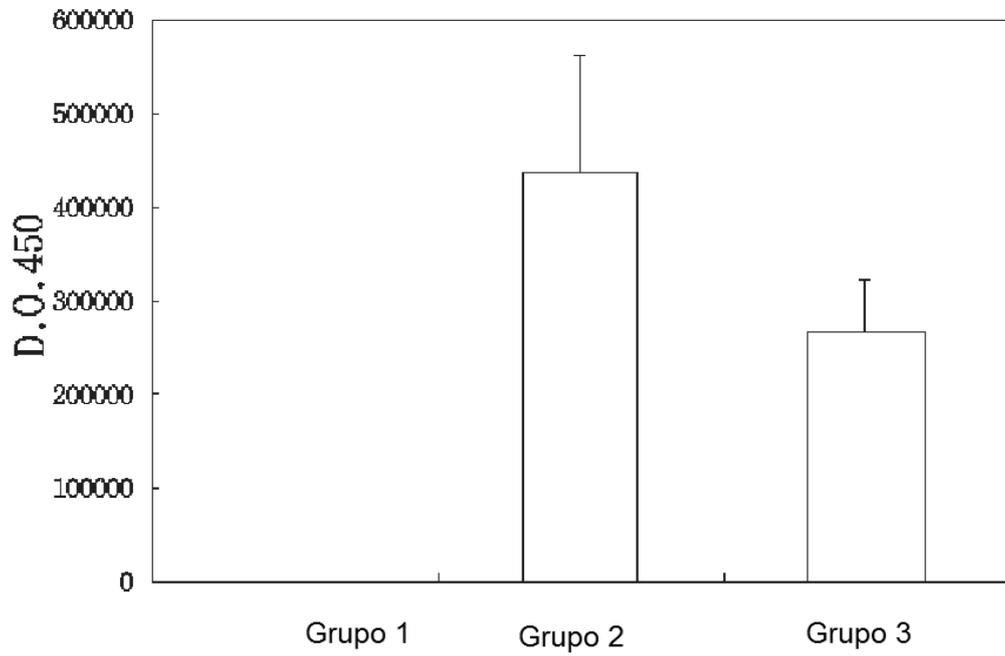
[Fig. 19]



[Fig. 20]

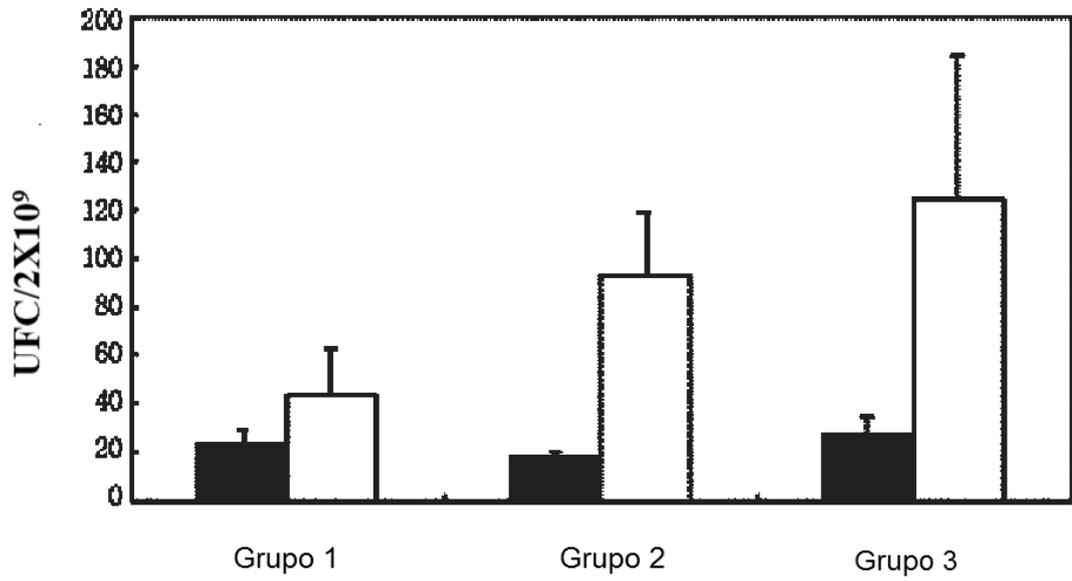


[Fig. 21]

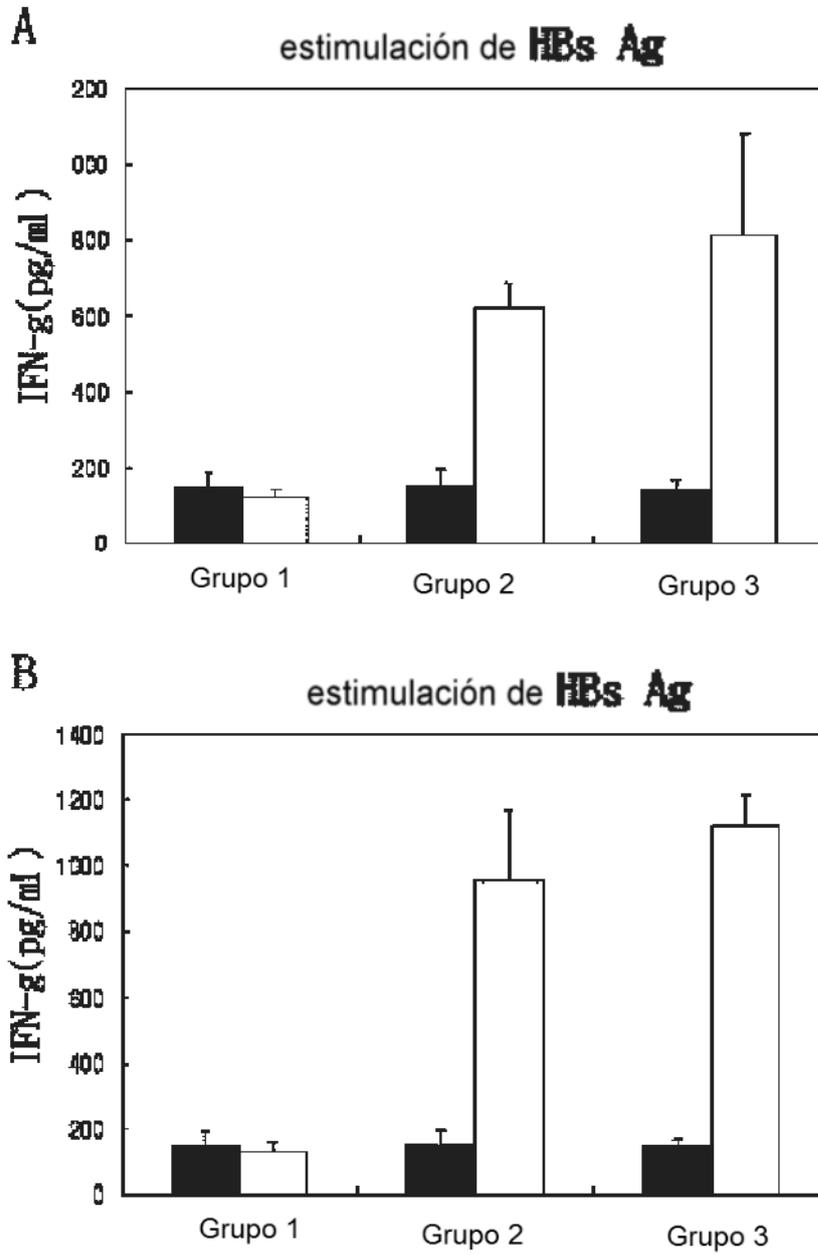


[Fig. 22]

estimulación de **HBs Ag**



[Fig. 23]



[Fig. 24]

