



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 536**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/51** (2006.01)  
**C07K 14/18** (2006.01)  
**A61K 39/29** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98922096 .7**  
96 Fecha de presentación : **06.05.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **0980434**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2000**

54 Título: **Producción intracelular de polipéptido E2 truncado de la hepatitis C.**

30 Prioridad: **06.05.1997 US 45675 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.11.2009**

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**  
**4560 Horton Street**  
**Emeryville, California 94608, US**

72 Inventor/es: **Houghton, Michael;**  
**Choo, Qui-Lim;**  
**Abrignani, Sergio;**  
**Chien, David;**  
**Selby, Mark y**  
**Glazer, Edward**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 328 536 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**

Producción intracelular de polipéptido E2 truncado de la hepatitis C.

**5 Antecedentes de la invención****Campo técnico**

La presente invención atañe, en general, a proteínas víricas. En particular, la invención se refiere a procedimientos mejorados para aislar formas truncadas de la proteína E2 del virus de la hepatitis C que tienen propiedades biológicas mejoradas para usar en composiciones vacunales y como reactivos diagnósticos.

**Antecedentes de la invención**

El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa principal de la hepatitis parenteral noAnoB, que se transmite, principalmente, mediante transfusiones de sangre y contacto sexual. El virus está presente en el 0,4-2,0% de los donantes de sangre. La hepatitis crónica se desarrolla en aproximadamente un 50% de las infecciones y, de éstas, aproximadamente el 20% de los individuos infectados desarrolla cirrosis hepática que, en ocasiones, conduce a carcinoma hepatocelular. En consecuencia, el estudio y control de la enfermedad es de importancia médica.

Se conoce la secuencia genómica viral del VHC, como lo son los procedimientos para obtener la secuencia. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 89/04669 WO 90/11089 y WO 90/14436. El VHC tiene genoma de ARN monocatenario de 9,5 kb de sentido positivo y es miembro de la familia Flaviridae de virus. Sobre la base del análisis filogenético se han identificado al menos seis genotipos distintos aunque relacionados del VHC (Simmonds y col., *J. Gen. Virol.* (1993) 74:2391-2399). El virus codifica una única poliproteína que tiene más de 3000 residuos de aminoácidos (Choo y col., *Science* (1989) 244:359-362; Choo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:2451-2455; Han y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:1711-1715). La poliproteína se procesa al mismo tiempo y después de la traducción en proteínas tanto estructurales como no estructurales (NE).

En particular, hay tres posibles proteínas estructurales compuestas por la proteína N-terminal de la nucleocápside (denominada “núcleo” y dos glicoproteínas de la cubierta, “E1” (también conocida como E) y “E2” (también conocida como E2/NS1), (Véase Houghton y col., *Hepatology* (1991) 14:381-388, para una discusión sobre las proteínas del VHC, incluidas E1 y E2.) E1 se detecta como una especie de 32-35 kDa y se convierte en una única banda endo sensible a H de aproximadamente 18 kDa. Por el contrario, la E2 exhibe un complejo patrón tras inmunoprecipitación consistente con la generación de múltiples especies (Grakoui y col., *J. Virol.* (1993) 67:1385 1395; Tomei y col., *J. Virol.* (1993) 67:4017-4026). Las glicoproteínas E1 y E2 del VHC son de gran interés porque en estudios con primates se ha demostrado que son protectoras. (Choo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91:1294-1298).

Las proteínas E1 y E2 de longitud completa se conservan en el interior de las células y se ha demostrado que carecen del hidrato de carbono complejo cuando se expresan de forma estable o en un sistema transitorio del virus Vaccinia (Spaete y col., *Virology* (1992) 188:819-830; Ralston y col., *J. Virol.* (1993) 67:6753-6761). Dado que las proteínas E1 y E2 normalmente están unidas a la membrana en estos sistemas de expresión, los científicos que han realizado los experimentos habían pensado previamente que era deseable producir formas secretadas para facilitar la purificación de las proteínas para usos adicionales.

Por ejemplo, también se ha descrito una molécula de E2 del VHC, truncada en el aminoácido 661 y que se secreta a partir de células de mamífero. Spaete y col., *Virology* (1992) 188:819-830. La producción de moléculas de E1 y E2 secretadas truncadas del VHC también se ha desvelado en la Publicación Internacional N° WO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1996. Inudoh y col., *Vaccine* (1996) 14:1590-1596, describe la producción de una molécula E2 del VHC que carece del dominio hidrofóbico del extremo C. Esta proteína se secretó en el medio de cultivo y se descubrió que era más antigénica que sus homólogas producidas intracelularmente.

Según el sistema de expresión usado, es posible que dichas proteínas secretadas no conserven su conformación nativa y pueden incluir patrones de glicosilación modificados. Por tanto, se ha intentado la purificación de las proteínas E1 y E2 del VHC producidas intracelularmente con el fin de conservar la conformación nativa de las proteínas. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 92/08734, publicada el 29 de mayo de 1992.

A pesar de los anteriores intentos para obtener E1 y E2 del VHC, sigue existiendo la necesidad de procedimientos alternativos para purificar de forma eficaz las moléculas E1 y E2 inmunogénicas del VHC para usar en composiciones vacunales y como reactivos diagnósticos.

**Resumen de la invención**

La presente invención se basa en el aislamiento de proteínas E2 del VHC, que exhibe mejores propiedades biológicas. Las proteínas están truncadas y se pueden producir usando técnicas recombinantes. Normalmente, dichas proteínas truncadas se secretan al medio de cultivo. No obstante, las proteínas para usar en la presente memoria descriptiva se aíslan de las células en vez de del medio de cultivo. Las moléculas aisladas de este modo exhiben capacidades de unión al receptor potenciadas, funcionan mejor en los ensayos diseñados para medir la capacidad de las proteínas para

provocar la producción de anticuerpos neutralizantes del VHC y son más inmunorreactivas y, por tanto, proporcionan mejores reactivos diagnósticos en comparación con sus homólogos secretados.

En consecuencia, en una forma de realización, la invención está dirigida a un procedimiento para aislar un polipéptido E2 del VHC que carece de una porción de su extremo C comenzando en aproximadamente el aminoácido 715 numerado en referencia a la secuencia de aminoácidos de E2 de VHC1. El procedimiento comprende:

(a) proporcionar una población de células huésped transformadas con un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora para el polipéptido E2 de VHC, en la que la secuencia codificadora está operablemente unida a elementos control de modo que la secuencia codificadora se puede transcribir y traducir en la célula huésped;

(b) cultivar la población de células en las condiciones en las que el polipéptido E2 de VHC se expresa intracelularmente;

(c) fragmentar las células huésped; y

(d) aislar el polipéptido E2 de VHC de las células fragmentadas.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de longitud completa y la correspondiente secuencia de aminoácidos para E1 de VHC1, que incluye la secuencia señal en el extremo N y el dominio de anclaje a la membrana del extremo C.

Las figuras 2A-2C muestran la secuencia de nucleótidos de longitud completa y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la región E2/NS2 de VHC1 que incluye la secuencia señal del extremo N para E2 y el dominio de anclaje a la membrana del extremo C para E2.

La figura 3 representa los moldes de ADNc de E1 de VHC descritos en los Ejemplos. El núcleo a través de la región NS2 se muestra en la parte superior y se ha dibujado a escala; el NS3 distal a través de NSS no se ha dibujado a escala. La región E1 se ha expandido para mostrar mejor los diversos moldes. Los números en la derecha hacen referencia a la variable de aminoácido usada en cada molde.

La figura 4 representa algunos de los moldes de ADNc de 2 de VHC descritos en los Ejemplos. El núcleo a través de la región NS2 se muestra en la parte superior y se ha dibujado a escala; el NS3 distal a través de NS5 no se ha dibujado a escala. La región E2/NS2 se ha expandido para mostrar mejor los diversos moldes. La columna de la izquierda hace referencia a la variable de aminoácido usada en cada molde.

La figura 5 representa los resultados de una neutralización de ensayo de unión realizada con E2 secretada, truncada y producida intracelularmente (interna), E2 truncada.

### Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de virología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante, dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Animal, Cell culture* (R. Freshney, ed., 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Fundamental Virology*, 2ª Edition, vol. I & II (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds.); *Protein-Purification Applications: A Practical Approach*, (E.L.V. Harris y S. Angal, Eds., 1990); y T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman y Company, 1993).

Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas “uno”, “una” y “el” incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

### I. Definiciones

Al describir la presente invención se emplearán los términos siguientes y se pretende definirlos como se indica a continuación.

Por un “polipéptido E2” se quiere decir una molécula derivada de una región de E2 del VHC. La región de E2 madura del VHC1 comienza aproximadamente en el aminoácido 3A3-385 (véase la Figura 2). Un péptido señal comienza aproximadamente en el aminoácido 364 de la poliproteína. Por tanto, por un “polipéptido E2” se quiere decir una proteína precursora de E2, incluida la secuencia señal, o un polipéptido maduro de E2 que carece de esta secuencia, o incluso un polipéptido E2 con una secuencia señal heteróloga. El polipéptido E2 incluye una secuencia de anclaje a la membrana en el extremo C, que se produce aproximadamente en las posiciones de aminoácidos 715-730 y puede extenderse hasta aproximadamente el residuo aminoacídico 746 (véase, Lin y col. *J. virol.* (1994) 68: 5063-5073).

## ES 2 328 536 T3

Una región representativa de E2 del VHC1 se muestra en la Figura 2, respectivamente. Para los fines de la presente invención, la región de E2 se define con respecto al número de aminoácidos de la poliproteína codificada por el genoma de VHC1, designándose el iniciador metionina en la posición 1. No obstante, debe destacarse que el término un “polipéptido E2”, como se usa en la presente memoria descriptiva, no está limitado a la secuencia del VHC1. A este respecto, la correspondiente región de E2 en otro aislamiento del VHC se puede determinar con facilidad alineando las secuencias de los dos aislamientos de un modo que se llegue a la alineación máxima de las secuencias. Esto se puede realizar con numerosos paquetes de software de ordenador tales como ALIGN 1.0, disponible en la Universidad de Virginia, Departamento de Bioquímica (Attn.: Dr. William R. Pearson). (Véase, Pearson y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 85: 2444-2448).

Además, un “polipéptido E2”, como se define en la presente memoria descriptiva, no está limitado a un polipéptido que tiene la secuencia exacta representada en las figuras. De hecho, el genoma del VHC está en un estado de flujo constante y contiene varios dominios variables que exhiben grados relativamente altos de variabilidad entre los aislamientos. Es fácilmente evidente que los términos abarcan polipéptidos E2 de cualquiera de los diversos aislamientos del VHC, incluidos los aislamientos que tienen cualquiera de los 6 genotipos del VHC descritos en Simmonds y col., J. Gen. Virol, (1993) 74: 2391-2399), así como aislamientos recién identificados, y subtipos de estos aislamientos, tales como VHC1a, VHC1b etc.

Además, el término “polipéptido E2” abarca proteínas que incluyen modificaciones adicionales de la secuencia nativa, tales como deleciones, adiciones y sustituciones internas adicionales (normalmente de naturaleza conservadora). Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como las realizadas mediante mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tal como acontecimientos mutacionales que se producen de forma natural. Todas estas modificaciones están abarcadas por la presente invención con la condición de que los polipéptidos E2 modificados funcionan para el fin para el que están destinados. Por tanto, por ejemplo, si los polipéptidos E2 se han de usar en las composiciones vacunales, las modificaciones deben ser tales que no se pierda la actividad inmunológica (es decir, la capacidad para provocar una respuesta de anticuerpos frente al polipéptido). De igual forma, si los polipéptidos se han de usar con fines diagnósticos, se debe conservar tal capacidad.

Un polipéptido E2 “que carece de todo o parte de su dominio transmembrana” es un polipéptido E2, respectivamente, como se ha definido en lo que antecede, que se ha manipulado para delecionar todo o parte de la secuencia de anclaje a la membrana que funciona para asociar el polipéptido con el retículo endoplásmico. Normalmente, tal polipéptido es capaz de secretarse al medio de crecimiento en el que se cultiva un organismo que expresa la proteína. No obstante, para los propósitos de la presente invención, dichos polipéptidos también se pueden recuperar intracelularmente. La secreción al medio de cultivo se determina con facilidad usando una serie de técnicas de detección, incluida, por ejemplo, la electroforesis en gel de poliacrilamida y similares, y técnicas inmunológicas tales como ensayos de inmunoprecipitación tal como se describe en, por ejemplo, la Publicación Internacional N° EO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1996. Con E2, los polipéptidos que terminan con la posición aminoacídica aproximada 731 y superiores (también sobre la base de la numeración de la secuencia de E2 del VHC1) serán retenidos por la ER y no serán secretados. (Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1996. Cabe destacarse que estas posiciones de aminoácidos no son absolutas y que pueden variar en cierta medida.

Aunque en la presente memoria descriptiva no se indican ejemplos de todos los posibles truncamientos en el extremo C, debe apreciarse que truncamientos intermedios, tales como, por ejemplo, los polipéptidos E2 que finalizan en, por ejemplo, los aminoácidos 716, 717, 718 y sucesivos, también entran dentro de la presente invención. Por tanto, todo lo que es necesario es que los polipéptidos truncados de E2 permanezcan funcionales para el propósito deseado.

Un polipéptido E2 se produce “intracelularmente” cuando se encuentra en el interior de la célula, bien asociado con los componentes de la célula, tal como en asociación con el retículo endoplásmico (RE) o el aparato de Golgi, o cuando está presente en la fracción celular soluble. Los polipéptidos E2 de la presente invención también se pueden secretar al medio de crecimiento con la condición de que haya suficiente cantidad de los polipéptidos presente en el interior de la célula de modo que se puedan purificar de los lisados celulares usando técnicas descritas en la presente memoria descriptiva.

Una proteína E2 del VHC “inmunogénica” es una molécula que incluye al menos un epítipo de modo que la molécula es capaz de provocar una reacción inmunológica en un individuo al que se administra la proteína o, en el contexto diagnóstico, es capaz de reaccionar con anticuerpos dirigidos contra el VHC en cuestión.

Por “epítipo” se quiere decir un sitio sobre un antígeno tal que responden células B y/o células T específicas, lo que convierte a la molécula que incluye un epítipo en capaz de provocar una reacción inmunológica o capaz de reaccionar con los anticuerpos del VHC presentes en una muestra biológica. El término también se usa de forma intercambiable con “determinante antigénico” o “sitio determinante antigénico”. Un epítipo puede comprender 3 o más aminoácidos en una conformación espacial única para el epítipo. Generalmente, un epítipo consta de al menos 5 de dichos aminoácidos y, más habitualmente, consta de al menos 8-10 de tales aminoácidos. En la técnica se conocen procedimientos para determinar la conformación espacial de los aminoácidos e incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Además, la identificación de epítipos en una proteína dada se consigue fácilmente usando técnicas bien conocidas en la técnica, tal como mediante el uso de estudios de hidrofobicidad y mediante serología dirigida al sitio. Véase también Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:3998-4002 (procedimiento general de síntesis peptídica rápida para determinar la localización de los epítipos inmunogénicos

## ES 2 328 536 T3

en un antígeno dado); la patente de EE.UU. N° 4.708.871 (procedimientos para identificar y sintetizar químicamente epítomos de antígenos); y Geysen y col., Molecular Immunology (1986) 23:709-715 (técnica para identificar péptidos con afinidad elevada para un anticuerpo dado). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítomo se pueden identificar en un sencillo inmunoensayo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

Una “respuesta inmunológica”, como se usa en la presente memoria descriptiva, es el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular al polipéptido E1 y/o E2 cuando el polipéptido está presente en una composición vacunal.

Estos anticuerpos pueden también neutralizar la infectividad y/o mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo-complemento o anticuerpos para proporcionar protección a un huésped inmunizado. La reactividad inmunológica puede determinarse en inmunoensayos estándar, tales como ensayos de competición, bien conocidos en la técnica. Dos polinucleótidos o moléculas proteicas son “sustancialmente homólogas” cuando al menos aproximadamente el 40-50%, preferentemente al menos aproximadamente el 70-80% y más preferentemente al menos aproximadamente 85-95% de los nucleótidos o aminoácidos de las moléculas coinciden con una longitud definida de la molécula. Como se usa en la presente memoria descriptiva, sustancialmente homólogo también se refiere a moléculas que tienen secuencias que muestran identidad con la molécula específica de ácido nucleico o proteína. Moléculas de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas se pueden identificar en un experimento de hibridación de tipo southern en, por ejemplo, condiciones estrictas tal y como se define para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación adecuadas está dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., ant.; DNA Cloning, vols I & II, ant.; Nucleic Acid Hybridization, ant. Por ejemplo, la homología se puede determinar mediante la hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas. Los dúplex estables son aquéllos que, por ejemplo, resisten la digestión con una nucleasa(s) monocatenaria específica tal como S1. Dichos dúplex se pueden analizar mediante diversos procedimientos, tales como la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. “Rigurosidad” se refiere a las condiciones en una reacción de hibridación que favorecen la asociación de secuencias muy similares sobre las secuencias que difieren. Por ejemplo, se debería escoger la combinación de temperatura y concentración de sales que sea aproximadamente de 12 a 20 grados C inferior a la Tm calculada del híbrido en estudio.

Otras técnicas para determinar la identidad de secuencia son bien conocidas en la técnica e incluyen determinar la secuencia del polinucleótido o polipéptido de interés y compararla con una segunda secuencia. Programas disponibles en el paquete Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo los programas BESTFIT, FASTA y GAP, son capaces de calcular la identidad entre dos moléculas.

Una proteína o polipéptido “aislado” o “purificada” es una proteína que está separada y diferenciada de un organismo entero al que la proteína está normalmente asociada por naturaleza. Es evidente que el término indica proteínas de varios niveles de pureza. Normalmente, una composición que contiene una proteína purificada será una en la que al menos aproximadamente el 35%, preferentemente al menos aproximadamente el 40-50%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75-85%, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90% o más de la proteína total en la composición será la proteína en cuestión.

Una “secuencia codificadora” o una secuencia que “codifica” una proteína seleccionada es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia codificadora están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificadora puede incluir, entre otras, ADNc de secuencias de nucleótidos virales así como secuencias de ADN sintéticas y semisintéticas, y secuencias que incluyen análogos de bases. Una secuencia de terminación de la transcripción puede localizarse en 3' de la secuencia de codificación. “Elementos de control” se refiere colectivamente a secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores corriente arriba, potenciadores y similares, que, en conjunto, proporcionan la transcripción y traducción de una secuencia codificadora en una célula huésped. No todos estos elementos de control han de estar siempre presentes siempre y cuando el gen deseado se pueda transcribir y traducir.

Un elemento de control “dirige la transcripción” de una secuencia de codificación en una célula cuando la ARN polimerasa se une a la secuencia promotora y transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que a su vez se traduce en el polipéptido codificado por la secuencia codificadora.

“Operablemente unido” se refiere a una organización de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función habitual. Por tanto, los elementos de control operablemente unidos a una secuencia codificadora son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificadora cuando está presente la ARN polimerasa. Los elementos de control no necesitan estar contiguos a la secuencia codificadora, mientras que funcionen dirigiendo su expresión. Por tanto, por ejemplo, las secuencias intermedias sin traducir pero transcritas pueden estar presentes entre, por ejemplo, una secuencia promotora y la secuencia codificadora, y la secuencia promotora puede seguir considerándose “unida operablemente” a la secuencia codificadora.

“Recombinante”, como se usa en la presente memoria descriptiva para describir una molécula de ácido nucleico quiere decir un polinucleótido de ADNc genómico de origen semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación: (1) no está asociado con todo o parte del polinucleótido con el que está asociado por naturaleza; y/o (2) está unido a un polinucleótido aparte del que al que está unido por naturaleza. El término “recombinante”, como se usa con respecto a una proteína o polipéptido quiere decir un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. “Células huésped recombinantes”, “células huésped”, “células”, “líneas celulares”, “cultivos celulares” y otros términos que indican microorganismos procariotas o líneas de células eucarióticas cultivadas como entidades unicelulares, se usan de forma intercambiable y se refieren a células que pueden usarse, o que se han usado, como receptores de vectores recombinantes u otro ADN de transferencia, e incluyen la progenia de la célula original que se ha transfectado. Cabe entender que la progenia de una única célula parental no necesariamente tiene que ser completamente idéntica en morfología o en genómica o complementaria al ADN total de la parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La progenia de la célula parental que es suficientemente similar a la madre a caracterizar mediante la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido deseado, está incluida en la progenia que se pretende abarcar con esta definición, y está cubierta en los términos anteriores.

Por “sujeto vertebrado” se quiere decir cualquier miembro del subfilo cordados, incluidos, sin limitaciones, seres humanos y otros primates, incluidos primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio, incluidos roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluidas aves domésticas, salvajes y para juego tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. El término no indica una edad concreta. Por tanto, se pretende cubrir individuos tanto adultos como neonatos. Como se usa en la presente memoria descriptiva, una “muestra biológica” se refiere a una muestra de tejido o de fluido aislada de un individuo que incluye, entre otros, por ejemplo, sangre, plasma, suero, material fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, muestras de la piel, secreciones externas de la piel, los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, muestras derivadas del epitelio gástrico y la mucosa gástrica, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias, así como muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*, incluidos, entre otros, medios acondicionados resultantes del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo células recombinantes y componentes celulares.

Los términos “marcador” y “marcador detectable” se refieren a una molécula capaz de realizar detección, incluidas, entre otras, isótopos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (p. ej., biotina o haptenos) y similares. El término “fluorescente” se refiere a una sustancia o porción de la sustancia que es capaz de exhibir fluorescencia en la gama detectable. Ejemplos concretos de marcadores que se pueden usar con la invención incluyen, entre otros, fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferota, rojo Texas, luminol, ésteres de acradimo, NADPH,  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina y ureasa.

## II. Modos de llevar a cabo la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevos procedimientos para obtener polipéptidos E2 truncados por el extremo C producidos de forma recombinante a partir de lisados celulares, en lugar de obtenerlos directamente del medio de crecimiento. Como se demuestra en la presente memoria descriptiva, las moléculas purificadas de este modo poseen propiedades biológicas sorprendentemente mejores que sus homólogos secretados. Por ejemplo, las moléculas producidas intracelularmente exhiben capacidades de unión al receptor potenciadas, exhiben un funcionamiento superior en los ensayos diseñados para medir la capacidad de las proteínas para provocar la producción de anticuerpos neutralizantes del VHC y son más inmunoreactivas y, por tanto, proporcionan mejores reactivos diagnósticos en comparación con sus homólogos secretados.

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, las formas de E2 del VHC expresadas intracelularmente pueden asemejarse más estrechamente a las proteínas víricas nativas debido a las fracciones de hidratos de carbono presentes en las moléculas, mientras que las glicoproteínas secretadas pueden contener restos de hidratos de carbono o patrones de glicosilación modificados. Además, las formas de E2 producidas intracelularmente pueden tener una conformación diferente a la de las formas secretadas.

En particular, se han construido numerosos polipéptidos E2 truncados en el extremo C, que carecen de porciones del dominio transmembrana. Véase la Figura 4, respectivamente, y los ejemplos. Como se muestra en los ejemplos, un constructo truncado que germina en el aminoácido 715 y que en la presente memoria descriptiva se denomina “E2715” es sorprendentemente más inmunoreactivo cuando se purifica a partir de células recombinantes, que el E2715 secretado en el medio y purificado a partir de éste. Además, las moléculas que terminan en los aminoácidos 661 y 655 también muestran una inmunoreactividad potenciada. Por tanto, los polipéptidos de VHC truncados producidos intracelularmente son candidatos excelentes para vacunas y diagnósticos.

Los polipéptidos E2 truncados producidos intracelularmente se pueden obtener usando diversas técnicas. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden generar usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. A este respecto, se pueden crear sondas oligonucleotídicas basadas en las secuencias conocidas del genoma del VHC y usarse para sondar bibliotecas genómicas o de ADNc para el gen E2. Los genes se pueden también aislar usando técnicas estándar y, por ejemplo, enzimas de restricción empleadas para truncar el gen en porciones deseadas de la secuencia de longitud com-

pleta. De igual forma, el gen de E2 puede aislarse directamente de células y tejidos que lo contienen, usando técnicas conocidas tales como extracción con fenol, y además se puede manipular la secuencia para producir los truncamientos deseados. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., ant., para una descripción de las técnicas usadas para obtener y aislar ADN. Por último, los genes que codifican los polipéptidos E2 truncados se pueden producir por vía sintética según secuencias conocidas. La secuencia de nucleótidos se puede diseñar con los codones adecuados para la secuencia de aminoácidos concreta deseada. En general, se seleccionarán los codones preferidos para el huésped concreto en el que se va a expresar la secuencia. Generalmente, la secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapados preparados mediante procedimientos convencionales y reunidos en una secuencia codificadora completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair y col. (1984) *Science* 223:1299; Jay y col. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

Una vez que se han aislado o sintetizado las secuencias codificadoras de las proteínas deseadas, se pueden clonar en un vector adecuado o replicón para su expresión. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación y la selección de un vector de clonación adecuado es cuestión de elección. Ejemplos de vectores de ADN recombinante para clonación y de células huésped que pueden transformarse incluyen el bacteriófago  $\lambda$  (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (bacterias gramnegativas), pGV1106 (bacterias gramnegativas), pLAFR1 (bacterias gramnegativas), pME290 (bacterias gramnegativas distintas a *E. coli*), pHV14 (*E. coli* y *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*), pIJ61 (*Streptomyces*), pUC6 (*Streptomyces*), YIp5 (*Saccharomyces*), YCp19 (*Saccharomyces*) y virus del papiloma bovino (células de mamífero). Véase, en general, *DNA Cloning: Vols. I & II, ant.*; Sambrook y col., ant.; B. Perbal, ant.

También se pueden usar sistemas de expresión en células de insecto, tales como los sistemas de baculovirus, y son conocidos para el experto en la técnica y se describen en, por ejemplo, Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987). Materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en células de insecto/baculovirus están disponibles comercialmente en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). También se pueden usar sistemas de expresión en plantas para producir las proteínas truncadas E1 y E2. Generalmente, dichos sistemas usan vectores basados en virus para transfeccionar células vegetales con genes heterólogos. Para una descripción de dichos sistemas, véase, por ejemplo Porta y col., *Mol. Biotech.* (1996) 5:209-221; y Hackland y col., *Arch. Virol.* (1994) 139:1-22.

También encuentran utilidad con la presente invención sistemas virales, tales como un sistema de infección/transfección basado en vaccinia, tal y como se describe en Tomei y col., *J. Virol.* (1993) 67:4017-4026 y Selby y col., *J. Gen. Virol.* (1993) 74:1103-1113. En este sistema, las células son transfeccionadas primero *in vitro* con un virus de vaccinia recombinante que codifica la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa exhibe una especificidad exquisita en cuanto a que sólo transcribe moldes que llevan promotores de T7. Tras la infección, las células son transfeccionadas con el ADN de interés dirigido por un promotor de T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del virus vaccinia recombinante transcribe el ADN transfeccionado en ARN que después es traducido a la proteína por la maquinaria de traducción del huésped. El procedimiento proporciona una producción citoplásmica transitoria y de alto nivel de grandes cantidades de ARN y su(s) producto(s) de traducción.

El gen se puede colocar bajo el control de un promotor, un sitio de unión ala ribosoma (para la expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador (en conjunto denominados en la presente memoria descriptiva elementos "de control"), de modo que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido E1 o E2 deseado se transcribe a ARN en la célula huésped transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia codificadora puede o no contener un péptido señal o secuencia líder. Con la presente invención se pueden usar péptidos señal naturales o secuencias heterólogas. El huésped puede eliminar las secuencias líder en el procesamiento post-traduccional. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397. Dichas secuencias incluyen, entre otras, la líder tpa, así como la secuencia señal de la melitina de abeja.

También pueden ser deseables otras secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión de las secuencias de proteínas con respecto al crecimiento de la célula huésped.

Dichas secuencias reguladoras son conocidas para el experto en la técnica y entre los ejemplos se incluyen aquéllos que causan la expresión de un gen que se encenderá o apagará en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Otros tipos de elementos reguladores también pueden estar presentes en el vector, por ejemplo secuencias potenciadoras.

Las secuencias control y otras secuencias reguladoras pueden unirse a la secuencia codificadora antes de la inserción en un vector. Como alternativa, la secuencia codificadora se puede clonar directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción adecuado.

En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia codificadora de modo que pueda unirse a las secuencias control con la orientación adecuada; es decir, para mantener el marco de lectura adecuado. También puede ser deseable producir mutantes o análogos de la proteína E2. Los mutantes y análogos pueden prepararse mediante la delección de una porción de la secuencia que codifica la proteína, mediante inserción de una secuencia y/o mediante sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para modificar las secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., ant.; *DNA Cloning, Vols. I y II, ant.*; *Nucleic Acid Hybridization, ant.*

Después, el vector de expresión se usa para transformar una célula huésped adecuada. En la técnica se conocen numerosas líneas celulares de mamífero e incluyen líneas células inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), además de otras. De igual forma, con los presentes constructos de expresión pueden encontrar utilidad huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.* Las células huésped de levaduras útiles en la presente invención incluyen, entre otras, *saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltase*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Entre las células de insecto para usar con los vectores de expresión baculovirus se incluyen *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

Según el sistema de expresión y el huésped seleccionado, las proteínas de la presente invención son producidas por células huésped en crecimiento transformadas por un vector de expresión descrito en lo que antecede en las condiciones en las que se expresa la proteína de interés. La selección de las condiciones de crecimiento adecuadas está dentro de la experiencia en la técnica. A continuación se fragmentan las células por medios químicos, físicos o mecánicos, que lisan las células pero conservan los polipéptidos del VHC sustancialmente intactos. Las proteínas intracelulares también se pueden obtener eliminando los componentes de la pared o la membrana celular, por ejemplo mediante el uso de detergentes o disolventes orgánicos, de modo que se produce el escape de los polipéptidos E2. Dichos procedimientos son conocidos para los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Protein Purification Applications: A Practical Approach, (E.L.V. Harris y S. Angal, Eds., 1990).

Por ejemplo, entre los procedimientos para fragmentar las células para usar con la presente invención se incluyen: Sonicación o ultrasonicación; agitación, extrusión de líquidos o sólidos; tratamiento térmico; congelación-descongelación; desecación; descompresión explosiva; shock osmótico; tratamiento con enzimas líticas, incluidas proteasas tales como tripsina, neuraminidasa y lisozima; tratamiento con álcali; y el uso de detergentes y disolventes tales como sales biliares, dodecilsulfato sódico, Tritón, NP40 y CHAPS. La técnica concreta usada para fragmentar las células es en gran medida una cuestión de elección y dependerá del tipo de célula en el que se expresa el polipéptido, las condiciones de cultivo y cualquier pre-tratamiento usado. Tras la fragmentación de las células, los residuos celulares se eliminan, generalmente mediante centrifugación, y los polipéptidos E2 producidos intracelularmente se purifican después usando técnicas de purificación estándar tales como, entre otros, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, HPLC, técnicas de inmunoabsorción, cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación y similares.

Por ejemplo, un procedimiento para obtener los polipéptidos intracelulares de VHC de la presente invención implica purificación por afinidad, tal como cromatografía de afinidad usando anticuerpos específicos anti-E2 o mediante cromatografía de afinidad por lectina. Resinas de lectina particularmente preferidas son las que reconocen restos de manosa, tales como, entre otras, resinas derivadas de aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), aglutinina de *Lens culinaris* (LCA o lectina de lenteja), aglutinina de *Pisum sativum* (PSA o lectina de guisante), aglutinina de *Narcissus pseudonaruissus* (NPA) y aglutinina de *Allium ursinum* (AUA). La elección de resinas de afinidad adecuadas está dentro de la experiencia en la técnica. Tras la purificación por afinidad, los polipéptidos E2 se pueden purificar después usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica, tal como mediante cualquiera de las técnicas descritas en lo que antecede.

Por referencia puede ser deseable producir complejos de E1/E2. Dichos complejos se producen con facilidad mediante, por ejemplo, co-transfección de células huésped con constructos que codifican las proteínas truncadas de E1 y E2. La co-transfección se puede realizar en trans o en cis, es decir usando vectores distintos o usando un único vector que porta los dos genes de E1 y E2. Si se realiza usando un único vector, ambos genes pueden estar dirigidos por un único grupo de elementos de control o, como alternativa, los genes pueden estar presentes en el vector en casetes de expresión individuales dirigidos por elementos de control individuales. Tras la expresión, las proteínas E1 y E2 se asociarán de forma espontánea. Como alternativa, los complejos se pueden formar mezclando las proteínas individuales que se han producido por separado, bien en forma purificada o semipurificada, o incluso mezclando los medios de cultivo en los que se han cultivado las células huésped que expresan las proteínas. Véase la Publicación Internacional N° WO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1996, para una descripción de dichos complejos.

Sus complejos polipeptídicos de E2 producidos intracelularmente o los polinucleótidos que los codifican descritos en la presente memoria descriptiva se pueden usar para numerosos propósitos diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, las proteínas y polinucleótidos o anticuerpos generados frente a los mismos se pueden usar en diversos ensayos para determinar la presencia de anticuerpos reactivos y/o proteínas E2 en una muestra biológica para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad por VHC.

La presencia de anticuerpos reactivos con los polipéptidos del VHC y, al contrario, los antígenos reactivos con los anticuerpos generados, se pueden detectar usando técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas estándar, incluidos inmunoensayos tales como competición, reacción directa o ensayos de tipo sándwich. Entre dichos ensayos se incluyen transferencias de tipo western, pruebas de aglutinación, inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunolectroforesis, inmunoprecipitación, etc. Generalmente, las reacciones incluyen marcadores de revelado tales como marcadores fluorescentes, quimioluminis-

## ES 2 328 536 T3

centes, radioactivos o enzimáticas o moléculas colorantes, u otros procedimientos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos que han reaccionado frente a él.

5 En los ensayos se pueden usar soportes sólidos tales como nitrocelulosa, en forma de membrana o pocillos de microtitulación; polivinilcloruro, en láminas o pocillos de microtitulación; látex de poliestireno, en perlas o placas de microtitulación; fluoruro de polivinilideno; papel diazotizado; membranas de nylon; perlas activadas y similares.

10 Normalmente, el soporte sólido se hace reaccionar primero con la muestra biológica (o las proteínas E2), se lava y después se aplican los anticuerpos (o una muestra de la que se sospecha que contiene anticuerpos). Después de lavar para eliminar todo el ligando que no se haya unido se añade un resto ligante secundario en las condiciones de unión adecuadas de modo que el ligante secundario es capaz de asociarse de forma selectiva con el ligando unido. La presencia del ligante secundario se puede detectar usando técnicas bien conocidas en la materia. Normalmente, el ligante secundario comprenderá un anticuerpo dirigido contra los ligandos del anticuerpo. En la técnica se conocen  
15 numerosas moléculas de inmunoglobulina (Ig) anti-humana (p. Ej., Ig anti-humana de cabra o Ig anti-humana de conejo disponibles comercialmente). Preferentemente, las moléculas de Ig serán del tipo de IgG o IgA, no obstante, en algunos casos también puede ser adecuada la IgM. Las moléculas de Ig pueden conjugarse con facilidad con un marcador enzimático detectable, tal como peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina y ureasa, entre otros, usando procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Después se usa un  
20 sustrato enzimático adecuado para generar una señal detectable.

Como alternativa se puede usar un ensayo de tipo “sándwich con dos anticuerpos” para detectar las proteínas tal y como se ha descrito en la presente memoria descriptiva. En esta técnica, el soporte sólido se hace reaccionar primero con uno o más de los anticuerpos dirigidos contra E2, se lava y después se expone a la muestra problema. De nuevo  
25 se añaden anticuerpos y la reacción se visualiza usando una reacción de color directa o usando un segundo anticuerpo marcado, tal como una anti-inmunoglobulina marcada con peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o ureasa.

Los ensayos también se pueden realizar en solución, de modo que las proteínas virales y sus anticuerpos forman complejos en condiciones de precipitación. Los complejos precipitados se pueden separar después de la muestra problema mediante, por ejemplo, centrifugación. La mezcla de reacción se puede analizar para determinar la presencia o ausencia de complejos anticuerpo-antígeno usando cualquiera de una serie de procedimientos estándar, tal como los procedimientos inmunodiagnósticos descritos en lo que antecede.

35 Las proteínas E2, producidas como se ha descrito en lo que antecede, o los anticuerpos frente a las proteínas se pueden proporcionar en kits tal y como se describe en la presente memoria descriptiva para los propósitos de referencia únicamente con las instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de realizar inmunoensayos tal y como se ha descrito en lo que antecede. El kit también puede contener, según el inmunoensayo concreto usado, marcadores adecuados y otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares). Los inmunoensayos estándar, como los que se han descrito en lo que antecede, se pueden realizar usando estos kits. Los  
40 polipéptidos E2 y los polinucleótidos que codifican los polipéptidos también se pueden usar en composiciones vacunales, individualmente o en combinación, en, por ejemplo, vacunas profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (para tratar la infección tras el VHC) tal y como se describe en la presente memoria descriptiva sólo como referencia. Las vacunas pueden comprender mezclas de una o más proteínas de E2 (o secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas), tales como las proteínas de E2 derivadas de más de un aislamiento viral. La vacuna  
45 también puede administrarse junto con otros antígenos y agentes inmunorreguladores, por ejemplo inmunoglobulinas, citocinas, linfocinas y quimiocinas, incluidos, entre otros, IL-2, IL-2 modificada (cys125→ser125), GM-CSF, IL-12,  $\gamma$ -interferón, IP-10, MIP $\beta$  y RANTES.

50 Generalmente, las vacunas incluirán uno o más “excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables” tales como agua, solución salina, glicerol, etanol etc. Adicionalmente, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares.

Opcionalmente puede estar presente un transportador, que es una molécula que por sí sola no induce la producción de anticuerpos perjudicial para el individuo que recibe la composición. Normalmente, los transportadores adecuados  
55 son macromoléculas grandes que se metabolizan despacio, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas) y partículas víricas inactivas. Tales transportadores son bien conocidos para el experto en la técnica. Además, el polipéptido del VHC puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como el toxoide de difteria, tétanos, cólera etc.

60 También se pueden usar adyuvantes para potenciar la eficacia de las vacunas. Entre dichos adyuvantes se incluyen: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared de las células bacterianas), tales como, por ejemplo, (a) MF59 (publicación internacional n° WO90/14837), que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85 (que opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE (véase más adelante) aunque no se requiere) formuladas en partículas de submicras usando un microfluidificante tal como microfluidificante Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero

bloqueado con plurónico L121 y thr-MDP (véase más adelante) bien microfluidificado en una emulsión en submicras o agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula y (c) sistema adyuvante Rib<sup>TM</sup> (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared de la célula bacteriana del grupo compuesto por monofosforolípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (EPC), preferentemente MPL + EPC (Detox<sup>TM</sup>); (3) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como Stimulon<sup>TM</sup> (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o generarse partículas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes); (4) Adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2, etc.), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) mutantes destoxificados de una toxina ribosilante de ADP bacteriana tal como la toxina del cólera (TC), una toxina de pertussis (TP) o una toxina termolábil de *E. coli* (TL), particularmente TL-K63 (en la que la lisina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 63), TL-R72 (en la que la arginina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 72), TC-S109 (en la que la serina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 109) y TP-K9/G129 (en la que la lisina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 9 y la glicina sustituida en la posición 129) (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales W093/13202 y W092/19265); (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Los péptidos de muramilo incluyen, entre otros, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamato (no-MDP), N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE) etc.

Normalmente, las composiciones vacunales se preparan en forma de inyectables, bien en forma de soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas para potenciar el efecto adyuvante, tal y como se ha tratado en lo que antecede.

Las vacunas comprenderán una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas truncadas de E2, o complejos de proteínas o secuencias de nucleótidos que las codifican y cualquier otro de los componentes mencionados en lo que antecede, según sea necesario. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad de una proteína truncada de E2 que inducirá una respuesta inmunológica protectora en el individuo al que se le administra. Generalmente, tal respuesta tendrá como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmunitaria secretora, celular y/o mediada por anticuerpos a la vacuna. Normalmente, tal respuesta incluye, entre otros, uno o más de los siguientes efectos; la producción de anticuerpos de cualquiera de las clases inmunológicas, tales como inmunoglobulinas A, D, E, G o M; la proliferación de linfocitos B y T; la provisión de señales de activación, crecimiento y diferenciación para las células inmunológicas; la expansión de células T colaboradoras, células T supresoras y/o células T citotóxicas y/o poblaciones de células T  $\gamma\delta$ .

Preferentemente, la cantidad eficaz es suficiente para llevar a cabo el tratamiento o la prevención de los síntomas de enfermedad. La cantidad exacta necesaria variará en función del sujeto que se esté tratando, la edad y el estado general del individuo que se va a tratar; la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos; el grado de protección deseado; la gravedad de la afección que se esté tratando; el polipéptido de VHC concreto seleccionado y su modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz adecuada. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" caerá dentro de un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos de rutina.

Una vez formuladas, las vacunas se administran de forma convencional por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección, bien subcutánea o intramuscular. Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunoreguladores.

### 50 III. Parte experimental

A continuación se encuentran ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no están destinados a limitar el ámbito de la presente invención de ningún modo.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permiten algunos errores y desviaciones experimentales.

#### 60 *Materiales y procedimientos*

##### *Moldes de VHC*

Usando PCR se ha generado una serie de moldes de E1 truncada, que se muestran en la figura 3, y moldes de E2, que se muestran en la figura 4. El cebador 5' adecuado que contiene un residuo de metionina y se usó un sitio *NcoI* junto con los cebadores 3' que tenían un codón de terminación tras la variable de la cubierta designada y, por último, para E1, un sitio *BamHI*. Ambos oligos tenían secuencias inespecíficas en los extremos para facilitar digestiones más eficaces por las enzimas *NcoI* y *BamHI*. Los fragmentos digeridos de la PCR se ligaron en pTM1 digerido con *NcoI/BamHI* (Elroy-Stein y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743 6747). El vector pTM1 contiene el

## ES 2 328 536 T3

promotor de T7 y la secuencia líder EMC proximal al sitio de clonación *NcoI* que corresponde al primer residuo de metionina codificado por el ADN designado. Los moldes de E2 se digirieron con *NcoI* y *AscI* y se clonaron en *NcoI*(parcial)/*AscI*-pTM1-CE2 (Selby y col., J. Gen. Virol. (1993) 74: 1103-1113) para generar los clones H en los que las traducciones comenzaban en el aminoácido 1 y codifican las regiones del núcleo, E1 y de E2 designadas.

5 Para los polipéptidos truncados de E1 los moldes codificadores comenzaban con un residuo de metionina, seguida por isoleucina y después el aminoácido 172. En particular, se generaron moldes codificadores que comenzaban con un residuo de metionina, seguido por isoleucina y después el aminoácido 172 de la poliproteína del VHC y que continuaban hasta el aminoácido 330, y los clones de incrementos de 10 aminoácidos hasta el aminoácido 380. Los aminoácidos 173 hasta 191 corresponden al extremo C del núcleo, que aparentemente desempeña un papel como secuencia señal. Se piensa que el E1 maduro comienza en el aminoácido 192 de la poliproteína tras la escisión de la secuencia señal. Para los constructos de E2 truncados, la metionina en la posición 364 se usó como el extremo N en las construcciones. El aminoácido 364 corresponde al inicio aproximado del péptido señal de E2 (Hijikata y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:5547-5551; Ralston y col., J. Virol. (1993) 67:6753-6761). Se piensa que el E2 maduro comienza con el aminoácido 365. El extremo C escalonado varió desde el aminoácido 661 al 1006. En particular, los clones terminaban en los aminoácidos 661, 699, 710, 720, 725, 730, 760, 780, 807, 837, 906 y 1006.

Además de los clones descritos en lo que antecede y mostrados en la figura 4, los polipéptidos truncados de E2 que terminaban en los aminoácidos 500, 550, 590, 625, 655, y un constructo que terminaba en el aminoácido 715 y que incluía una delección adicional de la región hipervariable del extremo N, denominada  $\delta 715$ , también se prepararon como se ha descrito en lo que antecede.

### *Producción intracelular de E2 truncado de VHC*

25 Se expresó una molécula truncada de E2 que tenía su extremo C en el aminoácido 715<sub>lys</sub> ("E2<sub>715</sub>") como sigue. Para la transfección de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en DHFR usando las técnicas descritas en Spaete y col., Virol. (1992) 188:819-830 se usó un clon que terminaba en el aminoácido 715. Tras la expresión, las células de CHO se lisaron y el E2<sub>715</sub> producido intracelularmente se purificó mediante cromatografía en agarosa GNA, seguida por cromatografía de intercambio de cationes, del siguiente modo.

30 Para lisar las células, a las células CHO se añadieron a 4°C dos volúmenes de tampón de lisis (4% de Triton X-100 en Tris 0,1M a pH 8, EDTA 1 mM, 1  $\mu$ g/ml de pepstatina A y fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) 1 mM. La mezcla se homogeneizó en alícuotas en un homogeneizador Dounce de 40 ml usando el mortero B hermético (20 golpes). El homogeneizado se agitó a 12 K rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se ajustó con agua hasta 2% de glicón/Tris 50 mM a pH 8 y se homogeneizó de nuevo usando el mortero B (10 golpes). El homogeneizado se agitó como se ha indicado en lo que antecede y el E2<sub>715</sub> producido intracelularmente se purificó además a partir del sobrenadante del siguiente modo.

40 Una columna de agarosa GNA (volumen del lecho 4 ml, Vector Labs, Burlingame, CA) se pre-equilibró con tampón detergente (2% de Triton/Tris 50 mM a pH 8). La muestra de sobrenadante se aplicó a la columna a 4°C y la columna se lavó con 5 volúmenes de lecho del tampón de columna (0,1% de Triton/fosfato sódico 20 mM a pH 6). La columna también se lavó con 5 volúmenes de lecho de NaCl 1M. (Como alternativa se puede añadir NaCl al tampón detergente hasta una concentración de 1M antes de cargar la muestra en la columna). La proteína E2 se eluyó en 5 volúmenes de lecho de  $\alpha$ -D-manopiranosido de metilo (MMP) y NaCl 1M y se recogieron fracciones de 1,2 ml.

50 Las fracciones que contenían la proteína E2 se combinaron y diluyeron con 2 volúmenes de tampón de S-sefarosa (0,1% de Triton/fosfato sódico 20 mM a pH 6). Las fracciones combinadas y diluidas se dializaron en membrana (Spectra/Por, corte de peso molecular 1.000) contra 4 l de tampón de S-Sefarosa durante la noche a 4°C con agitación constante. Tras la diálisis, el dializado se aplicó a una columna de S-Sefarosa (flujo rápido, 4°C, volumen de lecho 4 ml, pre-equilibrada en tampón de S-sefarosa). La columna se lavó en 5 volúmenes de lecho del tampón S-sefarosa y las fracciones de 1 ml eluyeron en NaCl 0,5M en tampón de S-sefarosa. Las fracciones que contenían E2 se combinaron y la columna se lavó con NaCl 1M en tampón de S-sefarosa y se re-equilibró en tampón de S-sefarosa. El polipéptido E2  $\delta 715$  (descrito en lo que antecede), así como las moléculas de E2 que terminan en los aminoácidos 500, 550, 590, 625 y 655 también se produjeron tal y como se ha descrito en lo que antecede.

### *Producción de E2 de VHC truncado secretado*

60 Se expresó una molécula truncada de E2 que tenía su extremo C en el aminoácido 715<sub>lys</sub> ("E2<sub>715</sub>"). La molécula de E2 truncada se expresó usando un sistema de expresión en células de ovario de hámster chino/dihidrofolato reductasa (CHO/DHFR) como se describe en Spaete y col., Virol. (1992) 188:819-830. Tras la expresión, el E2<sub>715</sub> secretado se purificó para usar en otros experimentos tal como se describe en la Publicación Internacional N° WO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1006. El polipéptido E2  $\delta 715$  (descrito en lo que antecede), así como las moléculas de E2 que terminaban en los aminoácidos 500, 550, 590, 625 y 655 también se produjeron como se ha descrito en lo que antecede.

## ES 2 328 536 T3

### *Producción intracelular del complejo E1/E2*

Un complejo de E1/E2, incluido el complejo E1 y E2 de longitud completa, producido en las células HeLa, se aisló del siguiente modo. Células HeLa S3 se inocularon con virus vaccinia purificado de alta titulación que expresaban E1 y E2 en una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula y la mezcla se agitó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, las células infectadas se transfirieron a un matraz de agitación que contenía 8 litros de medio de agitación y se incubaron durante 3 días a 37°C. Las células se recogieron de nuevo mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón hipotónico (HEPES 20 mM, NaCl 10 mM, NaCl 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 120 ml) en hielo.

Tras la expresión, las células HeLa se lisaron con Triton X-100 y se aisló E1/E2 mediante cromatografía en agarosa GNA, seguida por cromatografía de intercambio catiónico usando el procedimiento usado para purificar el E2 expresado intracelularmente. El material resultante se proporcionó en tampón que contenía 0,05% de Triton X-100. El análisis en SDS-PAGE reductor mostró que tenía una banda relativamente estrecha de 55 kD consistente con la presencia de una gran cantidad de glicosilación de tipo manosa. Se estimó una pureza del 33%. El complejo se usó como control en los experimentos siguientes.

### Ejemplo 1

#### *Unión al receptor de E2 secretado e intracelular*

La E2 intracelular, y E2 secretada, purificada en agarosa GNA se usaron en ensayos de unión tal como se ha descrito en Rosa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1759-1763 y la Publicación Internacional N° WO 96/05513, publicada el 22 de febrero de 1996. Este ensayo valora la unión específica de las proteínas E2 a las células T de linfoma humano (células MOLT-4) y su neutralización en función de la valoración citofluorométrica de suero que neutraliza la unión de los antígenos a las células MOLT-4.

Como se muestra en la figura 5, la E2 intracelular (interna) se unía a las células con una eficacia aproximadamente 30 veces mayor que su homóloga secretada.

### Ejemplo 2

#### *Inmunoreactividad de la E2 secretada e intracelular*

La inmunoreactividad de la proteína E2 truncada producida intracelularmente también se comparó con la de la proteína E2 secretada usando anticuerpos monoclonales de ratón y sueros policlonales humanos.

#### *A. Estudio de exposición del epítipo de la E2 intracelular y secretada usando anticuerpos monoclonales anti-E2*

Los anticuerpos monoclonales de ratón usados en los ensayos se produjeron del siguiente modo. Los ratones se inmunizaron con el inmunogen especificado en la Tabla 1. Se obtuvieron células de bazo de ratones inmunizados y se condensaron con  $2,5 \times 10^7$  NSO/2 células de mieloma de ratón en 50% de polietilenglicol 4000 (Merck) usando el procedimiento descrito por Kohler y Milstein, Nature (1975) 256:495-497. Tras la condensación, las células se resuspendieron en HAT hecho con medio Dulbecco suplementado con aminoácidos no esenciales, 10% de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone Laboratories, Salt Lake City, UT) 100 UI/ml de penicilona, 100 µg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM, hipo xantina  $10^{-8}$ M, timidina  $4 \times 10^{-3}$  (todos los reactivos de Sigma). Se sembraron alícuotas de 100 µl en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Nunc, DK 4000 Roskilde, Dinamarca). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada con 10% de CO<sub>2</sub> en aire. Diez días después de la condensación, se sometieron a detección selectiva los sobrenadantes de cultivos que exhibían crecimiento del hibridoma mediante hemaglutinación para la producción de anticuerpos anti-B. Todos los cultivos positivos se expandieron a placas de 24 pocillos y las células se congelaron en nitrógeno líquido en un medio que contenía 90% (FCS y 10% de dimetilsulfóxido (Merck). Los hibridomas de interés se seleccionaron sobre la base de su especificidad, avidez e intensidad de la reacción de aglutinación y se volvieron a clonar dos veces mediante la técnica de la dilución límite. Para inducir líquido ascítico, los hibridomas reclutados se cultivaron en la cavidad peritoneal de ratones BALB/C o F<sub>2</sub>, (BALB/C X B10), a los que previamente se inyectó por vía intraperitoneal 0,5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpenindcano (Pristane, de Sigma).

Los isotipos de los anticuerpos se determinaron con un kit comercial basado en la aglutinación de glóbulos rojos de oveja acoplados con anticuerpos monoclonales de rata contra el isotipo de la inmunoglobulina de ratón (Serotec, 22 Bankside, Oxford, Inglaterra). El isotipo, especificidad y caracterización de los anticuerpos monoclonales se muestra en la Tabla 1.

ES 2 328 536 T3

TABLA 1

*Lista de anticuerpos monoclonales de VHC*

Nº de ID del AcMo	Isotipo	Especificidad	Caracterización	Inmunógeno
5E5/H7	IgG1	Anti e2 de VHC	Ac conformacional	HeLa e1/e2 (aa 1-967)
2A3/B12	ND	Anti e2 de VHC	Ac conformacional	HeLa e1/e2 (aa 1-967)
5E9/D10	ND	Anti e2 de VHC	Ac conformacional	HeLa e1/e2 (aa 1-967)
3F5/H6	ND	Anti e2 de VHC	Ac conformacional	HeLa e1/e2 (aa 1-967)
3D5/C3	IgG1	Anti e2 de VHC	Ac anti-epítipo lineal	HeLa e1/e2 (aa 1-967)
3E5-1	IgG1	Anti e2 de VHC	Ac anti-epítipo lineal	E2 de insecto (aa 404-661)

Los títulos de AcMo anti-e2 conformacional:

3E5/H7>3F5/H6>5E9/D10>B12

472,25	ND	Anti e2 de VHC	Anti-región hipervariable	Péptido e2 de VH
6A1	IgG1	Anti e2 de VHC	Ac conformacional (bloquea la unión al receptor de MOLT4)	CHO e1/e2 (aa 1-967)
6A21	IgG1	Anti e2 de VHC	Ac conformacional (bloquea la unión al receptor de MOLT4)	

## ES 2 328 536 T3

La exposición del epítipo de las proteínas E2 secretadas y producidas intracelularmente se determinó usando los anticuerpos monoclonales anteriores del siguiente modo. Placas costar de unión elevada se cargaron con 200  $\mu$ l de antígeno de E2 purificado (200 ng/pocillo), como se describe en la Tabla 2, que se habían diluido en tampón de recubrimiento. Las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>Od. Las placas se recubrieron después con 300  $\mu$ l de solución post-recubrimiento y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se aspiraron y a la placa se añadieron 300  $\mu$ l de solución de estabilidad. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, se aspiraron y se aplicaron golpes varias veces. Las placas se secaron en un liofilizador durante al menos 4 horas.

A las placas se añadieron 200  $\mu$ l de anticuerpos monoclonales prediluidos (1:100), especificados en la Tabla 2, y las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron 5 veces con tampón de lavado y se añadieron 200  $\mu$ l de 1:5 de conjugado K Fab'2 de IgG de cabra anti-ratón (H+L). Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron como se ha indicado en lo que antecede. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Como se puede apreciar, la proteína E2 secretada sólo se reconoció mediante un anticuerpo monoclonal contra un epítipo lineal, mientras que la E2 producida intracelularmente (interna) se reconoció mediante anticuerpos monoclonales contra epítipos lineales y conformacionales.

Tabla 2						
Evaluación de la exposición del epítipo mediante anticuerpos monoclonales anti-E2 murinos						
	AcMo anti-E1 CN 3D5/C3	Epítipo lineal del AcMo anti-E2 3E5-1	Epítipo conformacional del AcMo anti-E2 5E5/H7	Epítipo conformacional del AcMo anti-E2 3F5/H6	Epítipo neutralizante del AcMo anti-E2 6A21	
E2 interna en CHO (50%)	0,004	1,923	0,496	0,391	0,355	
Dímero secretado E2 CHO (pureza 80%)	0,000	1,392	0,037	0,025	0,009	
Dímero/Monómero secretado E2 CHO (pureza 60%)	0,007 0,001	1,833 1,605	0,161 0,122	0,115 0,067	0,140 0,051	
CN= Control negativo Corte= 0,350 DO						

### B. Estudio de inmunoreactividad de E2 secretada e intracelular usando seroconversión del VHC

Con el fin de determinar además la inmunoreactividad de la E2 truncada producida intracelularmente frente a la E2 secretada se realizaron paneles de seroconversión usando una fuente comercial de suero. Se añadieron 5  $\mu$ l de cada muestra de suero, diluidos en 200  $\mu$ l del diluyente de muestra, a las placas preparadas como se ha descrito en lo que antecede, usando los antígenos identificados en la Tabla 3. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron 5 veces con tampón de lavado. Se añadieron 200  $\mu$ l de conjugado de Fab'2 de IgG de cabra anti-humana (H+L) diluidos en diluyente de conjugado y las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron como se indica en lo que antecede y se desarrollaron usando 200  $\mu$ l de sustrato OPD.

Tabla 3

Evaluación de la sensibilidad del ensayo de ELISA con E2 mediante análisis del panel de seroconversión del VHC

	CHOE2 interna 50% de pureza	Dímero secretado E2 CHO (pureza 80%)	Monómero/Dímero secretado E2 CHO (pureza 60%)
Muestra	DO	DO	DO
PHV904-01	0,032	0,026	0,020
PHV904-02	0,040	0,041	0,028
PHV904-03	0,109	0,017	0,019
PHV904-04	0,505	0,048	0,029
PHV904-05	1,681	0,268	0,158
PHV904-06	1,095	0,152	0,082
PHV904-07	0,987	0,105	0,063

La E2 intracelular fue significativamente más sensible que cualquiera de las proteínas E2 secretadas en la detección de la seroconversión. Véase, por ejemplo, la Tabla 3 en la que se detallan los resultados de un ensayo típico.

Los resultados anteriores indican que la proteína E2 truncada producida intracelularmente es más inmunorreactiva que su homóloga secretada. Por tanto, la proteína intracelular proporciona un mejor reactivo diagnóstico debido a la inmunoreactividad potenciada.

#### C. Estudio de inmunoreactividad de E2 secretada e intracelular usando anticuerpos inmovilizados frente al VHC

Con el fin de determinar además la inmunoreactividad de la E2 truncada producida intracelularmente frente a la E2 secretada se realizaron estudios adicionales usando anticuerpos inmovilizados frente al VHC. Los anticuerpos usados en estos ensayos fueron anticuerpos monoclonales 6A21 y 3E5-1, ambos descritos en la Tabla 1 anterior, así como una preparación de anticuerpos IgG purificada a partir de suero de un paciente infectado por VHC y específicos de la región hipervariable en el extremo N de E2.

En particular, el anticuerpo FF25931 se purificó a partir de suero de paciente a través de una columna de afinidad por proteína G y después se conjugó con partículas paramagnéticas (Chiron Diagnostics, Walpole, MA) antes de usar en los ensayos. Los anticuerpos monoclonales 6A21 y 3E5-1 también se purificaron con proteína G a través de un gel de 5 ml (Pierce, Rockford, IL) y los anticuerpos se unieron de forma covalente a partículas magnéticas de látex (Bangs Laboratories, Fisher, IN) usando la química de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

El reactivo de detección usado en los ensayos fue antisuero policlonal de cobaya producido contra E2<sub>715</sub> secretada producida como se ha descrito en lo que antecede. 1 ml del antisuero policlonal se purificó mediante paso a través de 1 columna de Proteína A en gel de 1 ml (Pierce). El contenido en proteína se determinó leyendo la absorbancia a 280 nm. El anticuerpo se marcó con 2',6'-dimetil-4'-(N-succinimidiloxycarboxil)fenil-10-(3'-sulfopropil)-acridinio-9-carboxilato (NHS-NSP-DMAE) (Chiron Diagnostics, Walpole, MA).

Tanto los anticuerpos de fase sólida como el reactivo de detección se optimizaron y diluyeron en tampón de trabajo (Tris 50 mM pH 8,0, KCl 500 mM, EDTA 1 mM, 1,75% de BSA, 0,01% de Tween-20).

Los ensayos se realizaron del siguiente modo. En un tubo de poliestireno de 75 x 12 mm (Sarstedt, Newton, NC) se introdujeron 100 µl de la muestra y se añadieron 100 µl del anticuerpo de fase sólida a 30 µg/ensayo. Esto se incubó a 37°C durante 18 minutos. Se añadieron 100 µl del reactivo de detección en una cantidad de 20 x 10<sup>6</sup> unidades relativas de luz (URL) por ensayo y la reacción se dejó proceder durante 18 minutos a 37°C. El producto se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato, 0,1% de Tween-20 y los tubos se leyeron usando un Magic Lite Analyzer II (Chiron Diagnostics, Walpole, MA). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

## ES 2 328 536 T3

El ensayo se repitió usando el anticuerpo FF25931, inmovilizado sobre partículas paramagnéticas, como se ha descrito en lo que antecede y la detección se realizó usando el anticuerpo monoclonal 1G2/A7, específico de la región hipervariable en el extremo N de E2, conjugada con NHS-NSP-DMAE. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 5.

5 Como se puede apreciar en la Tabla 4, el anticuerpo monoclonal 3E5-1 reacciona con los truncamientos de E2 que terminan en el aminoácido 550 y superiores, tanto en los sobrenadantes (medios) como en los lisados intracelulares. No obstante, el anticuerpo monoclonal 6A21 que bloquea la unión de E2 en el ensayo Molt-4-NOB, no se une a los  
10 truncamientos de E2 que terminan entre los aminoácidos 500 y 625. Existe una inmunoreactividad sustancial con las moléculas que terminan en el aminoácido 655 y superiores. Por tanto, parece que los residuos por debajo del 655 se requieren para que la E2 asuma la estructura correcta para unirse a 6A21. La E2 que termina en el 661 también tiene una reactividad elevada a 6A21, pero la E2 que termina en 715 tiene una inmunoreactividad sustancialmente menor a 6A21. Este efecto se aprecia particularmente en el sobrenadante.

15 Como se muestra en las Tablas 4 y 5, el mismo efecto se aprecia con el anticuerpo FF25931, un anticuerpo específico de la región hipervariable en el extremo N de E2. Los truncamientos en 625, 655 y 661 fueron muy activos, pero se produjo un descenso con E2<sub>715</sub> tanto en el sobrenadante como en los medios. Las moléculas  $\delta$ 715 fueron sustancialmente inactivas con todos los anticuerpos analizados.

20 Los datos muestran que E2<sub>655</sub> y E2<sub>661</sub> son considerablemente inmunoreactivos.

Tabla 4

Anticuerpo de fase sólida:	3E5-1	6A21	FF25931
	Sobrenadante	Sobrenadante	Sobrenadante
Control	1047	1093	1771
500	1232	955	18033
550	1138476	1109	4682
590	1015661	955	4820
625	991775	1109	5282
655	775221	12043	99037
661	7405509	10980	88920
715	764918	2803	29044
$\delta$ 715	1032	1032	1602
	Lisado	Lisado	Lisado
Control	2449	1186	2726
500	1525	1078	5144
550	531177	1309	2618
590	480264	1324	2325
625	393624	1971	2110
655	389743	5421	58797
661	400492	2356	22453
$\delta$ 715	1571	1386	1771

ES 2 328 536 T3

Tabla 5	
Anticuerpo de fase sólida:	FF25931
	Sobrenadante
Control	2079
500	53623
550	9948
590	9748
625	11689
655	261589
661	204959
	Lisado
Control	2911
500	8778
550	4389
590	3388
625	7069
655	212166
661	148749

Ejemplo 3

40 *Inmunización de cobayas con E2 secretada e intracelular*

La inmunogenicidad de la E2<sub>715</sub> de VHC secretada y producida intracelularmente se determinó en cobayas. Cinco grupos de animales fueron inmunizados con los antígenos que se han descrito en lo que antecede, formulados con MF-75 y MTP-PE como adyuvante. El dímero E1/E2 interno de HeLa se usó como preparación control de E2. Los cobayas fueron inmunizadas por vía IM a 0, 1 y 3 meses con las dosis especificadas en la Tabla 6 y los sueros de los cobayas se recogieron y combinaron para estudios posteriores.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

## ES 2 328 536 T3

TABLA 6

*Prep. De E2 y dosis usadas para inmunizar cobayas*

Prep. de E2	Nº de grupo	Dosis <sup>a</sup>
E2 interna de CHO	5	80 µg
	6	8,0 µg
	7	0,8 µg
	8	8,0, 2,0, 0,8 µg
E2 secretada de CHO	9	80 µg
	10	8,0 µg
	11	0,8 µg
	12	8,0, 2,0, 0,8 µg
E1/E2 interno de HeLa	16	8,0, 2,0, 0,8 µg
<sup>a</sup> diluida en MF75-0 que contiene 50 µg de MTP-PE para la primera dosis y 10 µg para las dosis posteriores los días 0, 30 y 90. Se usaron cinco animales por grupo.		

Como se puede apreciar en la Tabla 7, la preparación de E2 interna en CHO produjo anticuerpos de bloqueo que parecían ser tan elevados o mayores a los anticuerpos producidos por los cobayas inmunizados con E1/E2 de HeLa. Las preparaciones de E2 secretada de CHO no produjeron anticuerpos de bloqueo detectables. Estos resultados sugieren que la E2 producida intracelularmente es muy superior a la forma extracelular secretada a la hora de inducir anticuerpos neutralizantes.

TABLA 7

*Anticuerpos de bloqueo frente al receptor putativo en cobayas inmunizados*

Prep. De E2	Nº de grupo	Dosis	NOB (E2-1a)	NOB (E2-1b)
E2 interna de CHO	5	80 µg	700	80
	6	8,0 µg	1000	ND
	7	0,8 µg	1500	ND
	8	8,0, 2 0,8 µg	1000	100
E2 secretada de CHO	9	80 µg	0	ND
	10	8,0 µg	0	ND
	11	0,8 µg	0	ND
	12	8,0, 2, 0,8 µg		ND
E1/E2 de HeLa	16	8,0, 2, 0,8 µg	600	400

## ES 2 328 536 T3

También como se muestra en la Tabla 7, el antígeno interno de E2 indujo títulos NOB frente al antígeno de VHC1a en contraste con la falta de anticuerpos neutralizantes inducidos por el antígeno de E2 secretada. Además, los cobayas inmunizados con el antígeno interno de E2 también desarrollaron anticuerpos que podían realizar una neutralización cruzada de la unión de E2 de VHC1b a la línea de células T usada.

5

Por tanto, se desvelan los procedimientos para obtener los polipéptidos E1 y E2 expresados de forma intracelular, como también lo son los procedimientos de uso de los mismos. Aunque las formas de realización preferidas de la invención sujeto se han descrito con algún detalle, debe entenderse que se pueden realizar variaciones obvias sin desviarse del espíritu y alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Un procedimiento para aislar un polipéptido E2 del virus de la hepatitis C (VHC), en el que el polipéptido E2 del VHC está truncado después de aproximadamente el aminoácido 715, numerado en referencia a la secuencia de aminoácidos de E2 del VHC1, en el que dicho procedimiento comprende:

10 (a) proporcionar una población de células huésped transformadas con un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora para dicho polipéptido E2 de VHC, en la que dicha secuencia codificadora está operablemente unida a elementos control, de modo que dicha secuencia codificadora se puede transcribir y traducir en la célula huésped;

15 (b) cultivar dicha población de células en las condiciones en las que dicho polipéptido E2 de VHC se expresa intracelularmente;

(c) alterar dichas células huésped; y

(d) aislar dicho polipéptido E2 de VHC de dichas células fragmentadas.

20 2. El procedimiento de cualquiera de la reivindicación 1, en el que dicho aislamiento se realiza usando cromatografía de afinidad.

25 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha cromatografía de afinidad es cromatografía en agarosa GNA.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 536 T3

170 METILECYSSERPHESE RILEPLIELEULEUALALEULEUSERCYSLEUTHRVALPROALA  
ATGATTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCT  
TACTAAACGAGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACCTGACACGGGCGA

E1 madura

190 SERALATYRGLNVALARGASNSERTHRGLYLEUTYRHSVALTHRASNAPCYSPROASN  
TCGGCCTACCAAGTGC GCAACTCCACGGGGCTCTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAAC  
AGCCGGATGGTTCACGCGTTGAGGTGCCCGGAGATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTG

210 SERSERILEVALTYRGLUALAALAASPALAILELEUHI STRHROGLYCYVALPROCYS  
TCGAGTATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGGTCCCTTGC  
AGCTCATAACACATGCTCCGCGGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACG

230 VALARGGLUGLYASNALASERARGCYSTRPVALALAMETTHRPROTHRVALALATHRARG  
GTTCTGTGAGGGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGG  
CAAGCACTCCCGTTGCGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCC

250 ASPGLYLYSLEUPROALATHRGLNLEUARGARGHISILEASPLEULEUVALGLYSERALA  
GATGGCAAACCTCCCCGCGACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTGCGGAGCGCC  
CTACCGTTTGAGGGGCGCTGCGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGG

270 THRLEUCYSSERALEUTYRVALGLYASPLEUCYSGLYSERVALPHELEUVALGLYGLN  
ACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTCTGCGGGTCTGTCTTTCTTGTGCGGCCAA  
TGGGAGACAAGCCGGGAGATGCACCCCTGGAGACGCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTT

290 LEUPHETHRPHESE RPROARGARGHISTRPTHRTHRGLNGLYCYASNCYSSERILETYR  
CTGTTTACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTAT  
GACAAATGGAAGAGAGGGTCCGCGGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATA

310 PROGLYHISILETHRGLYHISARGMETALATRPASPMETMETMETASNTRPSERPROTHR  
CCCGGCCATATAACGGGTACCCGATGGCATGGGATATGATGATGAACCTGGTCCCCTACG  
GGGCCGGTATATTGCCAGTGGCGTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGC

330 THRALALEUVALMETALAGLNLEULEUARGILEPROGINALALELEUASPMETILEALA  
ACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCAAGCCATCTTGACATGATCGCT  
TGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGA

Anclaje en el extremo C

350 GLYALAHISTRPGLYVALLEUALAGLYILEALATYRPHESERMETVALGLYASNTRPALA  
GGTGCTCACTGGGGAGTCCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACCTGGGCG  
CCACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGC

370 LYSVALLEUVALVALLEULEULEUPHEALAGLYOP  
AAGGTCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCTGA  
TTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCGACT

FIG. 1

ES 2 328 536 T3

364 METVALGLYASNTRPALALYSVALLEUVALVALLEULEULEUPHEALAGLYVALASPALA  
ATGGTGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCG  
TACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCGCGAGCTGCGC

E2 MADURA

384 GLUTHRHISVALTHRGLYGLYSERLAGLYHISTHRVALSERGLYPHEVALSERLEULEU  
GAAACCCACGTCACCGGGGAAGTGCCGGCCACACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTC  
CTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTACGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAG

404 ALAPROGLYALALYSGINASNVALGINLEULLEASNTHRASNGLYSERTRPHISLEUASN  
GCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAAT  
CGTGGTCCGCGGTTCTGCTTGCAGGTGCGACTAGTTGTGGTTGCCGTC AACCGTGGAGTTA

424 SERTHRALLALEUASNCYSASNASPSERLEUASNTHRGLYTRPLEUALAGLYLEUPHETYR  
AGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTAT  
TCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATA

444 HISHISLYSPHEASNSERSERGLYCYSROGLUARGLEUALASERCYSARGPROLEUTHR  
CACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACC  
GTGGTGTTC AAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGG

464 ASPPEASPLNGLYTRPGLYPROILESEPTYRALAASNGLYSERGLYPROASPLNARG  
GATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCGACCAGCGC  
CTAAAACCTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCCGG

484 PROTYRCYSTRPHISTYRPROPROLYSPROCYSGLYILEVALPROALALYSSSERVALCYS  
CCCTACTGCTGGCACTACCCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGGAAGAGTGTGTGT  
GGGATGACGACCGTGATGGGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGGCGCTTCTCACACACA

FIG. 2A

# ES 2 328 536 T3

504 GLYPROVALTYRCYSPHETHRPROSERPROVALVALVALGLYTHRTHRASPARGSERGLY  
GGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGC  
CCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCG

524 ALAPROTHRTRYRSETRPGLYGLUASNASPTHRASPVALPHEVALLEDASNASNTHRARG  
GCGCCACCTACAGCTGGGGTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCCTTAACAATACCAGG  
CGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCC

544 PROPROLEUGLYASNTRPPHEGLYCYSTHRTRPMETASNSETRHGLYPHETHRLYSVAL  
CCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTACCAAAGTG  
GGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCAC

564 CYSGLYALAPROPROCYSVALILEGLYGLYALAGLYASNASNTHRLEUHI SCYSPROTHR  
TGCGGAGCGCCTCCTTGTGTTCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACT  
ACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCGCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGA

584 ASPCYSPHEARGLYSHISPROASPALATHRTRYRSETRARGCYSGLYSERGLYPROTRPIE  
GATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATC  
CTAACGAAGGCGTTCGTAGGCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAG

604 THRPROARGCYSLEUVALASPTYRPROTYRARGLEUTRPHI STYRPROCYSTHRIEASN  
ACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAAC  
TGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTG

624 TYRTHRILEPHELYSILEARGMETTYRVALGLYGLYVALGLUHI SARGLEUGLUALAALA  
TACACCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTGGAACACAGGCTGGAAGCTGCC  
ATGTGGTATAAAITTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGG

## FIG. 2B

ES 2 328 536 T3

644 CYSASNTRPTHRARGGLYGLUARGCYSASPLEUGLUASPARGASPARGSERGLULEUSER  
TGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGC  
ACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCG

664 PROLEULEULEUTHRTHRTHRGLNTRPGLNVALLEUPROCYSSERPHEHTRHTRLEUPRO  
CCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCCTCCCGTGTTCCTTACAACCCTGCCA  
GGCAATGACGACTGGTGATGTGTCCCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGCACGGT

684 ALALEUSERTHRGLYLEUILEHISLEUHSGLNASNILEVALASPVALGLNTYRLEUTYR  
GCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTAC  
CGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATG

704 GLYVALGLYSERSERILEALASERTRPALAILELYSTRPGLUTYRVALVAILEULEUPHE  
GGGTGGGTCAAGCATCGCGTCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTGCTCCTCCTGTTC  
CCCCACCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGTAATTCACCTCATGCAGCAGGAGGACAAG

Anclaje en el extremo C

724 LEULEULEUALAASPALAARGVALCYSSERCYSLEUTRPMETMETLEULEUILESERGLN  
CTTCTGCTTGCAGACGCGCGGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAA  
GAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTT

P7

744 ALAGLUALAALALEUGLUASNLEUVALILELEUASNALAALASERLEUALAGLYTHRHS  
GCGGAAGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCAC  
CGCCTTCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTTCGTAGGGACCCGCCCTGCGTG

764 GLYLEUVALSERPHELEUVALPHEPHECYS PHEALATRPTYRLEULYSGLYLYSTRPVAL  
GGTCTTGATCCTTCCTCGTGTCTTCTGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTG  
CCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTACCCAC

FIG. 2C

784 PROGLYALAVALTYRTHRPHETRYRGLYMETTRPPROLEULEULEULEULEULEUALALEU  
CCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTG  
GGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAAC

NS2

804 PROGLNARGALATYRALALEUASPTHRGLUVALALALASERCYSGLYGLYVALVALLEU  
CCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTC  
GGGGTCGCCCCGATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAG

824 VALGLYLEUMETALALEUTHRLEUSERPROTYRTRYRLYSARGTYRILESERTRPCYSLEU  
GTCGGGTTGATGGCGCTAACTCTGTCCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTG  
CAGCCCCAACTACCGGATTGAGACAGTGGTATAATGTTTCGGGATATAGTCGACCACGAAC

844 TRPTRPLEUGLNTYRPHLEUTHRARGVALGLUALAGLNLEUHSVALTRPILEPROPRO  
TGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCC  
ACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTC-CGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGG

864 LEUASNVALARGGLYGLYARGASPALAVALILELEULEUMETCYSALAVALHISPROTHR  
CTCAACGTCCGAGGGGGCGCGACGCCGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACT  
GAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGA

884 LEUVALPHEASPILETHRLYSLEULEULEUALAVALPHEGLYPROLEUTRPILELEUGLN  
CTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAA  
GACCATAAACTGTAGTGGTTTAAACGACGACCGGCAGAACCTGGGGAAACCTAAGAAGTT

904 ALASERLEULEULYSVALPROTYRPHEVALARGVALGLNGLYLEULEUARGPHECYSALA  
CCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCG  
CGGTCAAACGAATTTTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGC

FIG. 2D

ES 2 328 536 T3

924 LEUALAARGLYSMETILEGLYGLYHISTYRVALGLNMETVALILEILELYSLEUGLYALA  
TTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAAGTTAGGGGCG  
AATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTCAATCCCCGC

944 LEUTHRGLYTHRTRYRVALTYRASNHISLEUTHRPROLEUARGASPTRPALAHISASNGLY  
CTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAAACGGC  
GAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTGCGG

964 LEUARGASPLEUALAVALALAVLGLUPROVALVALPHESERGLNMETGLUTHRLYSLEU  
TTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTC  
AACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTGACGAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAG

984 ILETHRTRPGLYALAASPTHRALAALACYSGLYASPILEILEASNGLYLEUPROVALSER  
ATCAGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGGTGACATCATCAACGGCTTGCCTGTTTCC  
TAGTGCACCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGG

1004 ALAARGARGGLYARGGLUILELEULEUGLYPROALAASPGLYMETVALSERLYSGLYTRP  
GCCCCGAGGGGCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGTTGG  
CGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTGCGGCTACCTTACCAGAGGTTCCCAACC

1024 ARGLEULEU  
AGGTTGCTG  
TCCAACGAC

FIG. 2E

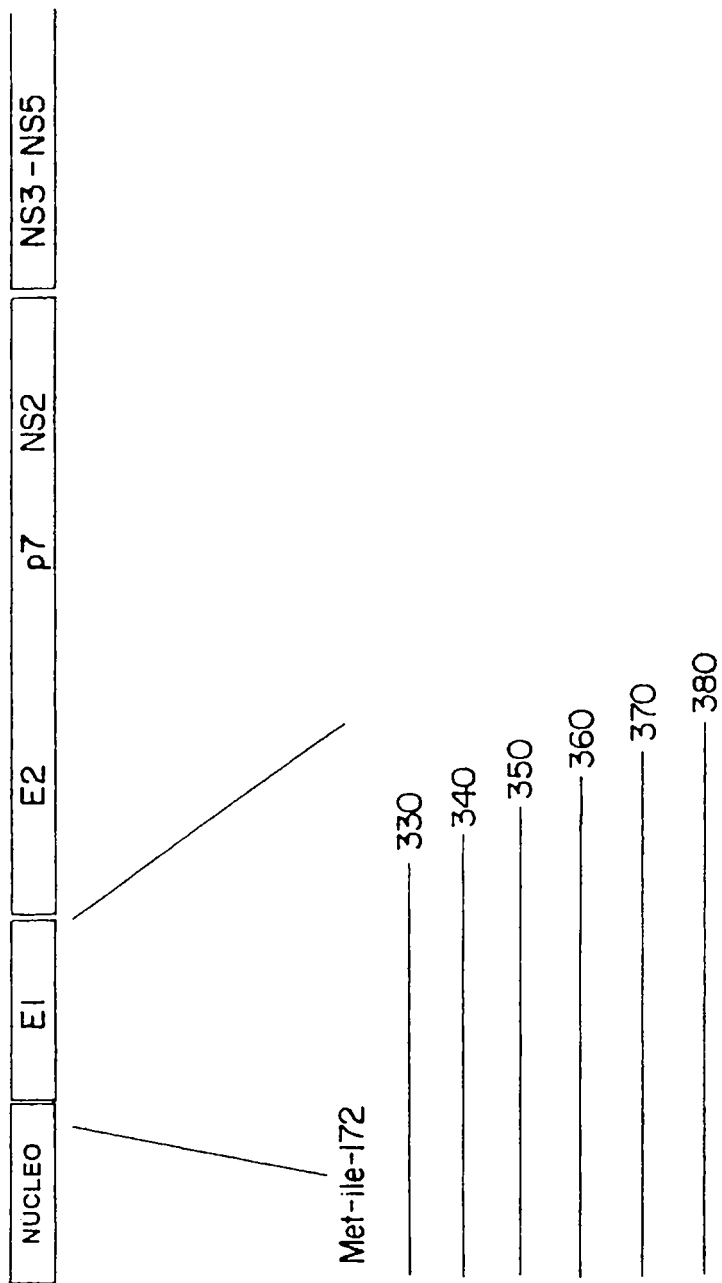


FIG. 3

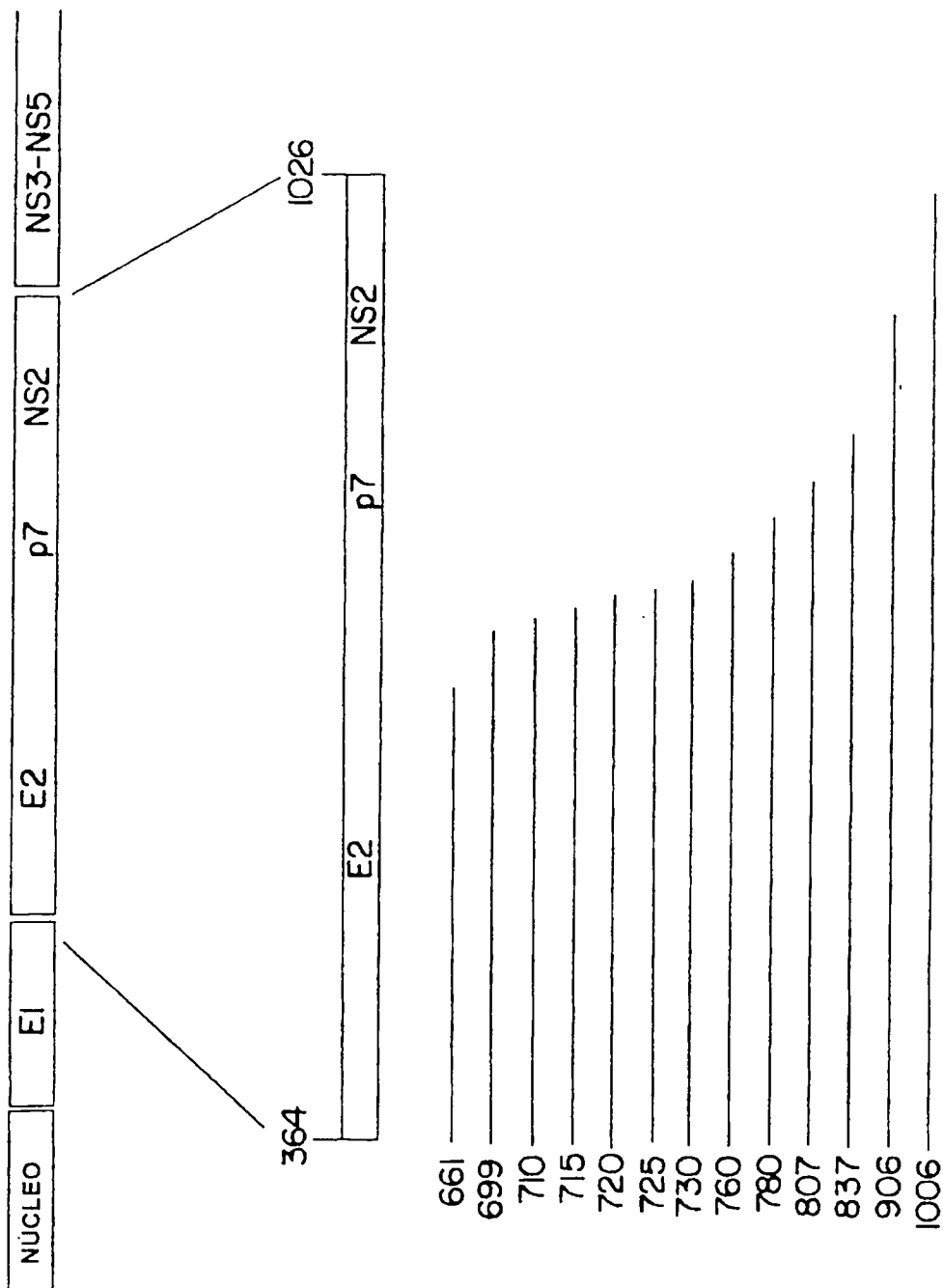


FIG. 4

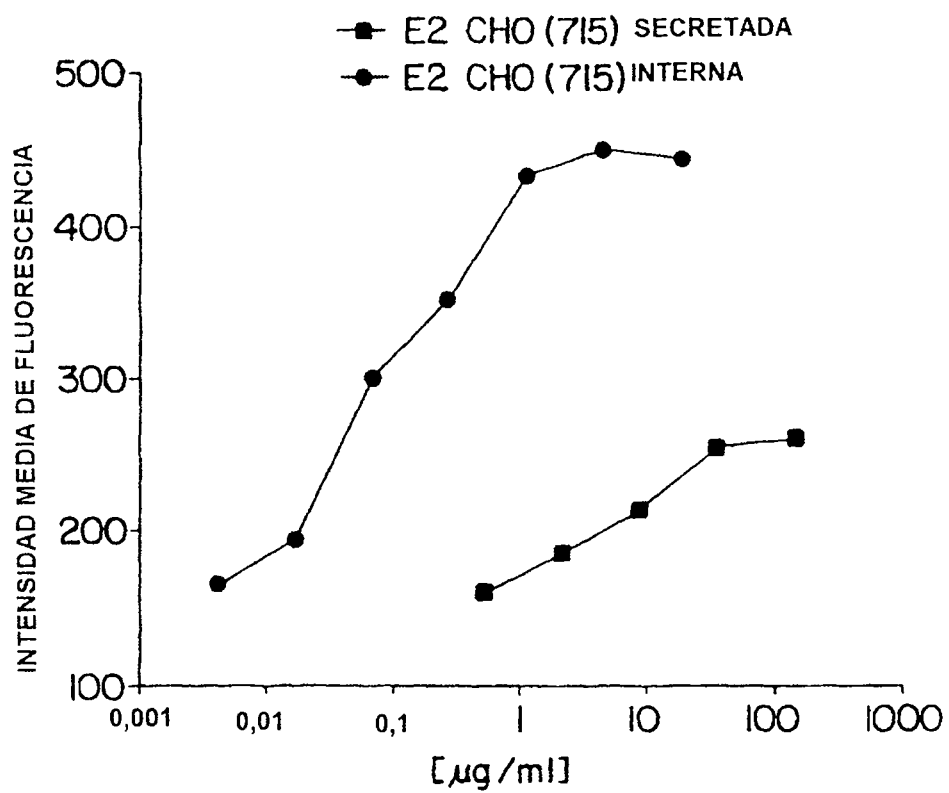


FIG. 5