



NUMERO DE PUBLICATION : 1000167A4

NUMERO DE DEPOT : 8700666

Classif. Internat. : A61K C12N

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 05 Juillet 1988

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 17 Juin 1987 à 14h40  
à l' Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY  
3-1 Yamadaoka Suita-shi, Osaka(JAPON)

représenté(e)s par : KEUTERICKX Joseph, OFFICE PARETTE (Fred. Maes),  
Avenue d'Auderghem 33 Bte 4 - 1040 - BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : ANTIGENE DU VIRUS DE L'HEPATITE B ET PROCEDE POUR SA PRODUCTIC

Priorité(s) 18.06.86 JP JPA61143412

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 05 Juillet 1988  
PAR DELEGATION SPECIALE :  
DIRECTEUR DE L'OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

L. WUYTS

"Antigène du virus de l'hépatite B et procédé pour sa production".

-----

La présente invention se rapporte à un antigène du virus de l'hépatite B (que l'on appellera souvent ci-après "antigène HBV") contenant un antigène de surface du virus de l'hépatite B (souvent appelé ci-après "antigène HBs").

5 Plus particulièrement, la présente invention concerne un antigène HBV comprenant un antigène HBs et, lié à son extrémité N, un peptide de 10 acides aminés. Le peptide de 10 acides aminés consiste en un résidu de méthionine et une séquence de 9 acides aminés qui fait partie de l'antigène

10 pré-HBs (souvent appelé ci-après "PreS") qui est un polypeptide occasionnellement lié à l'extrémité N de l'antigène HBs à l'état naturel. L'antigène selon la présente invention a une grande pureté et est de qualité uniforme, il peut être utilisé de manière sûre et efficace en tant que vaccin

15 pour l'hépatite B. Par ailleurs, l'antigène de la présente invention peut être produit économiquement et sûrement en masse. Par ailleurs, du fait de son antigénicité spécifique, l'antigène de la présente invention peut être avantageusement utilisé en tant que réactif de diagnostic pour des

20 anticorps anti-virus de l'hépatite B, et peut également être utilisé pour la préparation des anticorps anti-virus de l'hépatite B.

On sait que l'infection par le virus de l'hépatite B provoque l'hépatite B aiguë ou chronique, et l'hépatocirrhose

25 et le cancer du foie qui sont souvent provoqués inter-curremment par l'hépatite chronique B. Il existe, dans l'Asie du Sud-Est et la région centrale de l'Afrique, un grand nombre de patients souffrant de l'hépatite B, et des

patients latents porteurs du virus de l'hépatite B, comme des porteurs en incubation et personnes qui ont reçu une infection inapparente, sont répandus dans le monde entier. On estime que le nombre de patients, dans le monde, atteint environ 200 millions, et que le nombre de patients latents au Japon est d'environ 3 millions, ce qui représente environ 2,5% de la population du Japon. En d'autres termes, l'hépatite B est une maladie infectieuse de grande importance, non seulement au Japon mais également dans des pays du monde entier et par conséquent, la prévention, le diagnostic précoce et le traitement précoce de la maladie sont d'une importance globale.

La particule complète du virus de l'hépatite B est appelée particule de Dane. La particule atteint environ 42 nm de diamètre et sa surface est couverte de l'antigène HBs. Sous la surface, la particule a un noyau d'environ 27 nm de diamètre. Dans le noyau, il y a un ADN circulaire dont la partie principale a une structure à deux brins mais la petite partie restante a une structure à un seul brin, et une ADN polymérase. La longueur de l'ADN circulaire est d'environ 3.200 paires de bases lorsque la partie à un seul brin de l'ADN circulaire est artificiellement réparée de manière que la partie à un seul brin devienne à deux brins et que l'ADN circulaire devienne un ADN complètement à deux brins. Un antigène HBs est un polypeptide de 226 acides aminés et son poids moléculaire est d'environ  $2,3 \times 10^4$  daltons. Certains des antigènes HBs à l'état naturel sont considérés comme ayant un polypeptide appelé PreS lié à l'extrémité N. Un PreS comprend 163 acides aminés. Du point de vue diagnostic et épidémiologie, les antigènes HBs sont grossièrement classés en quatre types, c'est-à-dire adr, adw, ayr et ayw. On sait que dans les pays d'Asie comprenant le Japon, le type adr prédomine et dans les pays européens, c'est le type adw.

Pour la prévention de l'infection par l'hépatite B,

il est nécessaire d'utiliser un antigène HBs comme vaccin. L'antigène HBs est obtenu d'un virus de l'hépatite B (souvent appelé ci-après "HBV"). Pour obtenir l'antigène HBs, HBV doit proliférer. HBV ne peut proliférer que dans les corps de l'homme et des chimpanzés, parce que la gamme des hôtes de HBV est limitée à l'être humain et aux chimpanzés. Cependant, les corps humains ne peuvent être utilisés comme hôtes pour la prolifération de HBV. De même, en ce qui concerne les chimpanzés, il est extrêmement difficile d'utiliser ceux-ci comme hôte, parce que leur nombre est limité et que l'importation des chimpanzés est extrêmement limitée du point de vue préservation de leur race. Par ailleurs, une méthode de prolifération de HBV dans une culture de cellules d'une lignée de cellules dérivée de l'être humain ou du chimpanzé n'est pas utile parce que HBV ne peut proliférer dans les cellules d'une lignée de cellules à grande échelle. Pour ces raisons, un antigène HBs a traditionnellement été produit en isolant les particules du virus du sang d'un porteur humain silencieux, porteur d'une forte concentration des particules du virus de l'hépatite B et en purifiant les particules isolées du virus par centrifugation, dessalement, etc. Cependant, comme la fourniture du sang ci-dessus mentionné est limitée, l'antigène HBs n'a pu être produit à une échelle suffisamment importante pour répondre à la demande globale. Par suite, l'antigène HBs est précieux et d'un prix élevé.

Le problème ci-dessus mentionné rencontré dans la production de l'antigène HBs est bien connu de ceux qui sont compétents en la matière et diverses tentatives ont été faites pour le résoudre. Par exemple, une méthode a été proposée, dans laquelle Escherichia coli, Bacillus subtilis, un pseudonas, une levure, une moisissure ou analogue est transformé par un ADN recombinant contenant un ADN codant pour un antigène HBs afin d'obtenir un transformant et l'antigène HBs est produit par le transformant (voir par

exemple descriptions de demandes de brevets au Japon N°s 55-104887, 56-63995, 57-181099, 57-209298, 59-317999, 59-36699, 59-74988 et 60-89431, la description de la demande de brevet britannique N° 2 125 047A et la publication de la traduction en japonais N° 56-501128 de la demande de brevet PCT N° WO81/00577; une méthode dans laquelle des cellules somatiques cultivées sont transformées par un ADN recombinant contenant un ADN codant pour un antigène HBs afin d'obtenir un transformant et l'antigène HBs est produit par le transformant obtenu (voir par exemple la description de la demande de brevet au Japon N° 58-995); une méthode dans laquelle un antigène HBs est produit par mise en culture de cellules qui sont infectées en persistance par le virus de l'hépatite B (voir description de la demande de brevet au Japon N° 56-150020); une méthode dans laquelle un antigène HBs est chimiquement synthétisé (voir description de la demande de brevet au Japon N° 57-136527); et analogues. Cependant, toutes ces méthodes présentent des inconvénients ou défauts par rapport au rendement, à l'immunogénicité et à la qualité de l'antigène HBs produit. Par conséquent, aucune de ces méthodes n'a été mise en usage pratique.

Les présents inventeurs ont effectué des études extensives et intensives afin de résoudre les problèmes ci-dessus. En effet, les présents inventeurs ont effectué le clonage d'un ADN codant pour un antigène HBs, qui est capable de prévenir l'infection par HBV, et PreS. Par ailleurs, les présents inventeurs ont déterminé la séquence des bases de l'ADN obtenu par le clonage. Alors, en utilisant l'ADN cloné, les présents inventeurs ont étudié la production, par technique d'ADN recombinant, d'un antigène d'excellente qualité pouvant être utilisé de manière efficace et sûre en tant que vaccin pour l'hépatite B et pouvant être produit de manière économique et stable à un fort rendement. Par suite, les présents inventeurs ont trouvé qu'un antigène

comprenant une séquence d'acides aminés d'un antigène HBs et, liée à son extrémité N, une séquence spécifique de 9 acides aminés dérivée de PreS et une méthionine dans cet ordre, est de bonne qualité et d'excellentes immunogénéicité et antigénicité en tant que vaccin pour l'hépatite B et peut être produit en toute sécurité et de manière stable à grande échelle et à bas prix. La présente invention a été accomplie en se basant sur la découverte ci-dessus.

Par conséquent, la présente invention a pour objet la production d'un antigène excellent non seulement par son immunogénéicité et son antigénicité lorsqu'il est utilisé comme vaccin pour l'hépatite B, mais également par sa qualité.

La présente invention a pour autre objet un procédé de production d'un antigène du type ci-dessus mentionné.

La présente invention a pour autre objet un vaccin comprenant une quantité immunogéniquement efficace d'un antigène du type ci-dessus mentionné.

L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description explicative qui va suivre faite en référence aux dessins schématiques annexés donnés uniquement à titre d'exemple illustrant plusieurs modes de réalisation de l'invention et dans lesquels :

- la figure 1 montre un organigramme indiquant le clonage de l'ADN de HBV et la préparation de pM1B11;

- la figure 2 montre un organigramme indiquant la préparation de séries du plasmide pBH103;

- les figures 3a à 3e montrent les séquences des bases d'une partie du plasmide pBH103-ME5 et d'une partie du plasmide pBH103-CT ainsi que la séquence des acides aminés de l'antigène de la présente invention et d'un antigène HBs; et

- la figure 4 montre les résultats d'une électrophorèse

sur gel de polyacrylamide-SDS de l'antigène de la présente invention.

Essentiellement, selon la présente invention, on prévoit un antigène du virus de l'hépatite B comprenant une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) qui suit :

Met Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn  
 Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly  
 10 Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe  
 Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln  
 Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn  
 Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly  
 Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
 15 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro  
 Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe  
 Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys  
 Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr  
 Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu  
 20 Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro  
 Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly  
 Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
 Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile  
 Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg  
 25 Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe  
 Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val  
 Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val  
 Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr  
 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser  
 30 Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe  
 Cys Leu Trp Val Tyr Ile  
 . . . . . (I).

Dans laquelle Ala indique un résidu d'alanine, Arg  
 35 un résidu d'arginine, Asn un résidu d'asparagine, Asp un

résidu d'acide aspartique, Cys un résidu de cystéine, Gln un résidu de glutamine, Glu un résidu d'acide glutamique, Gly un résidu de glycine, His un résidu d'histidine, Ile un résidu d'isoleucine, Lys un résidu de lysine, Leu un résidu de leucine, Met un résidu de méthionine, Phe un résidu de phénylalanine, Pro un résidu de proline, Ser un résidu de sérine, Thr un résidu de thréonine, Trp un résidu de tryptophane, Tyr un résidu de tyrosine et Val un résidu de valine.

10 De même, selon la présente invention, on prévoit un acide désoxyribonucléique qui comprend une séquence des bases codant pour un antigène du virus de l'hépatite B comprenant une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) ci-dessus mentionnée.

15 Par ailleurs, selon la présente invention, on prévoit un procédé de production d'un antigène du virus de l'hépatite B comprenant une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) ci-dessus mentionnée, qui comprend :

20 (a) la ligature d'un acide désoxyribonucléique comprenant une séquence des bases codant pour ledit antigène à un vecteur d'expression répliquable pour obtenir un ADN recombinant répliquable comprenant ledit acide désoxyribonucléique et ledit vecteur d'expression répliquable;

25 (b) la transformation des cellules d'un micro-organisme ou d'une culture de cellules par ledit ADN recombinant répliquable pour former des transformants;

30 (c) la sélection desdits transformants à partir de cellules parentes du micro-organisme ou de la culture de cellules;

(d) l'incubation desdits transformants, forçant lesdits transformants à exprimer ledit acide désoxyribonucléique et à produire un antigène; et

35 (e) l'isolement dudit antigène des transformants incubés.

Par ailleurs, selon la présente invention, on prévoit un vaccin comprenant une quantité immunogéniquement efficace d'un antigène du virus de l'hépatite B de l'être humain comprenant une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) ci-dessus mentionnés.

Un antigène HBV selon la présente invention comprend la séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) ci-dessus. La séquence d'acides aminés de la formule (I) contient une séquence de 226 acides aminés qui correspond à la séquence entière d'acides aminés d'un antigène HBs et, liée à son extrémité N, une séquence de 9 acides aminés qui fait partie de PreS, et une méthionine dans cet ordre. PreS est une pré-séquence de l'antigène HBs comme on l'a précédemment mentionné. la séquence des 9 acides aminés est la même que la séquence d'acides aminés C-terminale de PreS.

L'antigène de la présente invention comprenant une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) peut être préparé et identifié par un procédé comprenant les étapes (1) à (11) ci-dessous mentionnées.

A l'étape (1), des particules de Dane (particules complètes de HBV) sont isolées du sang et purifiées. En tant que sang à utiliser pour l'isolement des particules de Dane, on peut de préférence employer un sang positif à l'antigène HBe plutôt qu'un sang positif à l'antigène HBs. La raison en est la suivante. L'antigène HBs est présent de manière inhérente à la surface de la particule de Dane, mais est souvent libéré de cette particule et présent dans le sang à un état indépendant de la surface de la particule de Dane. Par conséquent, même si un certain échantillon de sang recueilli est positif à l'antigène HBs, l'échantillon de sang ne contient pas toujours la particule de Dane. Au contraire, l'antigène HBe est présent dans le coeur ou noyau de la particule de Dane et n'est jamais libéré de cette particule. Par conséquent, si un certain échantillon

de sang recueilli est positif à l'antigène HBe, un tel échantillon de sang contient toujours la particule de Dane. Dans cette étape, des techniques habituelles conventionnelles telles qu'une ultracentrifugation et analogues peuvent être utilisées pour l'isolement et la purification des particules de Dane.

A l'étape (2), l'ADN de HBV est réparé par l'ADN polymérase endogène et récupéré. L'ADN de HBV est de forme circulaire et une partie de l'ADN de HBV est de manière inhérente à deux brins, mais la petite partie restante est de manière inhérente à un seul brin. La partie à un seul brin est réparée par des techniques habituelles de manière que l'ADN de HBV ait une structure totalement à deux brins. Dans ce but, l'ADN polymérase inhérente aux particules de HBV peut être utilisée. L'ADN réparé peut être extrait et récupéré par des techniques habituelles comme une technique d'extraction au phénol et analogues.

A l'étape (3), l'ADN de HBV est cloné. En tant que vecteur pour le clonage, on peut utiliser tous les vecteurs connus tels que des plasmides ayant une adaptabilité à une cellule procaryote comme Escherichia coli, Bacillus subtilis et analogues et des vecteurs dérivés du  $\lambda$  phage et de T4 phages. A cette étape, il est souhaitable qu'une combinaison appropriée d'un vecteur clonant et d'une cellule hôte soit choisie. La détection et l'identification de l'ADN de HBV cloné peuvent s'effectuer par des méthodes habituelles conventionnelles telles qu'une hybridation sur plaque et une hybridation par tache du Sud. Une sonde à utiliser pour la détection et l'identification peut être préparée par des méthodes habituelles conventionnelles, par exemple la méthode employée à l'étape 2 de l'Exemple 1 donné ci-dessous. Dans la mise en pratique du processus de cette étape, il faut noter ce qui suit. En général, la quantité de l'ADN de HBV qui est récupérée à l'étape (2) qui précède est extrêmement faible. Par conséquent, il est préférable d'entreprendre

d'abord le clonage de l'ADN de HBV , en utilisant un vecteur phagique ayant une forte capacité de clonage et subséquemment, l'ADN de HBV ainsi cloné est encore cloné en utilisant un vecteur plasmidique.

5           A l'étape (4), l'ADN de HBV est ligaturé à un vecteur d'expression répliquable pour obtenir un ADN recombinant. En tant que vecteur d'expression répliquable utilisé dans cette étape, on peut mentionner tous les vecteurs connus comme les plasmides d'expression, les vecteurs  
10   navettes d'expression, les vecteurs d'expression de dérivés de virus tels que le virus de la vaccine et SV40 et analogues, qui ont une adaptabilité aux cellules hôtes à utiliser. En ce qui concerne la cellule hôte, l'explication en sera donnée ultérieurement.

15           La ligature de l'ADN de HBV à un vecteur d'expression répliquable peut s'effectuer par une méthode habituelle. Dans la mise en pratique de la ligature , il faut noter particulièrement que l'ADN recombinant qui est capable  
20   d'exprimer l'ADN de HBV pour produire un antigène ayant une antigénicité et une immunogénicité souhaitées chez un hôte peut ne pas être obtenu simplement par ligature directe de l'ADN de HBV à un vecteur d'expression répliquable . Par conséquent, selon une technique habituelle, un vecteur d'expression auquel doit être ligaturé l'ADN de HBV peut  
25   être modifié, afin que :

(i) la quantité de production de l'antigène puisse être accrue autant que possible;

(ii) l'antigénicité et l'immunogénicité d'un produit d'expression (antigène) puissent être accrues;

30           (iii) la stabilité de l'ADN de HBV dans un vecteur d'expression et une cellule hôte puisse être accrue;

(iv) l'antigène produit par expression génétique dans une cellule hôte puisse être sécrété hors de la cellule hôte de manière que l'extraction et la purification de  
35   l'antigène puissent être simplifiées;

(v) l'antigène HBV produit par l'expression génétique puisse être empêché d'être décomposé par l'action d'une enzyme protéolytique dans la cellule; et

5 (vi) les conditions de mise en culture d'un transformant puissent être simplifiées afin de faciliter la mise en culture.

La modification ci-dessus mentionnée d'un vecteur d'expression peut être entreprise comme suit. En effet, les ADN qui ont la capacité d'obtenir les effets mentionnés aux articles (i) à (vi) ci-dessus sont ligaturés seuls ou en combinaison à un vecteur d'expression. Pour ces ADN, on peut mentionner, par exemple, une séquence de réplication autonome (ARS) ou origine de réplication (ORI) excellente par sa capacité à la réplication d'un vecteur d'expression, un promoteur excellent par son pouvoir d'expression génétique, un ADN codant pour un peptide qui est capable d'améliorer l'immunogénicité et l'antigénicité du présent antigène, un ADN contenant un gène pour la stabilisation d'un vecteur, un ADN codant pour un peptide de signal, etc.

20 A l'étape (5), une cellule hôte est transformée par un ADN recombinant obtenu à l'étape (4) ci-dessus mentionnée, et le transformant est isolé.

A cette étape, la transformation d'une cellule hôte par l'ADN recombinant est effectuée par une méthode habituelle telle qu'une méthode aux cations alcalins. Comme 25 exemples de cellules hôtes, on peut mentionner des cellules procaryotes telles que Escherichia coli et Bacillus subtilis, et des cellules eucaryotes telles que la levure et une culture de cellules d'organisme supérieur.

30 Les transformants formés par la transformation sont choisis et isolés de cellules parentes qui restent non transformées par l'ADN recombinant, en utilisant, comme critère, par exemple, un trait phénotypique tel qu'une résistance à un produit pharmaceutique et une auxotrophie 35 des transformants qui est impartie par le vecteur

d'expression répliquable.

5 A l'étape (6), le transformant est mis en culture et l'antigène est extrait. A cette étape, le transformant est mis en culture par des méthodes habituelles conventionnelles pour exprimer l'ADN de HBV et produire l'antigène. Afin d'augmenter la quantité de l'antigène produit et de stabiliser l'antigène, la composition d'un milieu de culture, les conditions de culture et de sous-culture des transformants peuvent être choisies de manière appropriée. 10 Pour l'extraction de l'antigène, des méthodes habituelles conventionnelles telles qu'une interruption physique des cellules, peuvent être employées.

15 A l'étape (7), la quantité de l'antigène dans l'extrait produit par le transformant est déterminée. La quantité de l'antigène produit contenu dans l'extrait obtenu à l'étape (6) peut être mesurée par des méthodes habituelles conventionnelles, comme la méthode dans laquelle on utilise une trousse du commerce pour déterminer la quantité de l'antigène HBs.

20 A l'étape (8), la séquence des bases du gène de structure de l'antigène HBV est déterminée. A cette étape, le vecteur d'expression est extrait du transformant qui présente une activité d'antigène HBs. Alors, le gène de l'ADN de HBV ligaturé au vecteur est séparé du vecteur et la séquence des bases de l'ADN de HBV est déterminée. La 25 détermination de la séquence des bases peut être effectuée par des méthodes habituelles conventionnelles, par exemple, la méthode de terminaison de chaîne au didésoxy et analogues.

30 Par suite de la détermination de la séquence des bases de l'ADN de HBV, le codage de l'ADN pour l'antigène obtenu par le procédé ci-dessus mentionné s'est révélé avoir une séquence des bases de la formule (II) suivante :

ATG TCG AGG ACT GGG GAC CCT GCA CCG AAC  
 ATG GAG AAC ACA ACA TCA GGA TTC CTA GGA  
 CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC  
 TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCA CAG  
 5 AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT  
 TTT CTA GGG GGA GCA CCC ACG TGT CCT GGC  
 CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC  
 TCA CCA ACC TCT TGT CCT CCA ATT TGT CCT  
 GGC TAT CGC TGG ATG TGT CTG CCG CGT TTT  
 10 ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC  
 CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAC  
 CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA CTT  
 CCA GGA ACA TCA ACT ACC AGC ACG GGA CCA  
 TGC AAG ACC TGC ACG ATT CCT GCT CAA GGA  
 15 ACC TCT ATG TTT CCC TCT TGT TGC TGT ACA  
 AAA CCT TCG GAC GGA AAC TGC ACT TGT ATT  
 CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GCA AGA  
 TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC  
 TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT  
 20 CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT  
 TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT  
 TGG GGG CCA AGT CTG TAC AAC ATC TTG AGT  
 CCC TTT TTA CCG CTA TTA CCA ATT TTC TTT  
 TGT CTT TGG GTA TAC ATT  
 25 . . . . . (II)

où A représente un résidu d'acide désoxyadénylique,  
 G un résidu d'acide désoxyguanylique, C un résidu  
 d'acide désoxycytidylique et T un résidu d'acide  
 30 désoxythymidylique, et les extrémités gauche et  
 droite de la formule (II) représentent le côté du  
 groupe 5'-hydroxyle et le côté du groupe 3'-  
 hydroxyle, respectivement.

La séquence des bases représentée par la formule (II)  
 35 ci-dessus mentionnée codé pour une séquence d'acides aminés

représentée par la formule (I) mentionnée précédemment.

5 A l'étape (9), l'antigène HBV produit par l'expression est isolé de l'extrait obtenu à l'étape (6) ci-dessus par des méthodes habituelles d'extraction et de purification.

10 A cette étape, des techniques conventionnelles peuvent être utilisées en combinaison. Par exemple, diverses techniques telles qu'une filtration, un dessalement, une centrifugation et une chromatographie en colonne peuvent être utilisées en combinaison pour extraire et purifier le présent antigène.

15 Ainsi, on obtient un antigène du virus de l'hépatite B de la présente invention qui comprend une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) ci-dessus sous une forme sensiblement pure.

20 A l'étape (10), le poids moléculaire de l'antigène HBV produit est déterminé, et l'antigène est identifié. La mesure du poids moléculaire de l'antigène peut être effectuée par des méthodes habituelles conventionnelles, comme électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, analyse ultracentrifuge, osmométrie à membrane, filtration sur gel et analogues. L'identification de l'antigène peut être effectuée par une méthode habituelle utilisant l'antigénicité comme critère, par exemple une méthode de réaction de précipitation par diffusion sur gel, une radiodétermination d'immunité (RIA), une détermination de l'immuno-adsorbant lié à l'enzyme (ELISA), une hémagglutination passive inverse, une hémagglutination passive, une hémagglutination par immunoadhérence, une immuno-  
30 électrophorèse et analogues. Il est préférable que l'identification de l'antigène HBV soit entreprise en employant, en combinaison, deux méthodes ou plus du point de vue précision d'identification.

35 A l'étape (11), l'immunogénicité de l'antigène HBV produit est déterminée. Selon "Minimum Requirements for

Biological Products" (Notification N° 159, Ministère de la Santé et du Bien Public"), un essai de titration est entrepris en utilisant une souris, un cobaye, etc.

5 Comme on l'a mentionné ci-dessus, l'antigène HBV de la présente invention peut être produit par technique d'ADN recombinant en utilisant un ADN codant pour l'antigène HBV ayant une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I). En effet, le présent antigène HBV peut être produit par une méthode comprenant :

10 (a) la ligature d'un ADN comprenant une séquence de bases codant pour l'antigène HBV à un vecteur d'expression répliquable pour obtenir un ADN recombinant répliquable comprenant ledit acide désoxyribonucléique et ledit vecteur d'expression répliquable;

15 (b) la transformation de cellules d'un micro-organisme ou d'une culture de cellules par ledit ADN recombinant répliquable pour former des transformants;

(c) la sélection desdits transformants de cellules parentes du micro-organisme ou de la culture de cellules;

20 (d) l'incubation desdits transformants, forçant lesdits transformants à exprimer ledit acide désoxyribonucléique et à produire un antigène ;

(e) l'isolement de l'antigène des transformants incubés.

25 Comme ADN comprenant une séquence de bases pour l'antigène HBV, on peut employer l'ADN ci-dessus mentionné comprenant une séquence de bases représentée par la formule (II).

30 Selon la dégénération du code génétique, il est possible de substituer au moins une base de la séquence des bases d'un gène par un autre type de base sans forcer la séquence d'acides aminés du polypeptide produit à partir du gène à changer. Par conséquent, l'ADN de HBV peut également avoir toute séquence de bases qui a été changée  
35 par substitution selon la dégénération du code génétique.

Dans ce cas, la séquence d'acides aminés déduite de la séquence des bases obtenue par la substitution ci-dessus mentionnée est identique à la séquence d'acides aminés de la formulé (I) définie précédemment. L'ADN ayant la séquence des bases de la formule (II) peut être obtenu en répétant les étapes 1 à 6 ci-dessus mentionnées par clonage. Alternativement, une partie ou la totalité de l'ADN peut être organo-chimiquement synthétisée en utilisant un synthétiseur automatique d'ADN du commerce etc.

10 Comme hôte et vecteur d'expression répliquable à utiliser pour la production de l'antigène HBV de la présente invention par technique d'ADN recombinant, on peut employer ceux qui sont mentionnés ci-dessus pour les étapes (4) et (5).

15 L'antigène de la présente invention peut également être obtenu sous la forme d'un peptide fusionné comprenant la séquence d'acides aminés de l'antigène HBV et, liée à son extrémité C et/ou son extrémité N, la séquence d'acides aminés d'un autre peptide tel qu'un peptide dérivé d'un vecteur d'expression, un peptide dérivé d'un linker, un peptide dérivé de PreS ayant une séquence d'acides aminés autre que la séquence d'acides aminés C-terminale de 9 acides aminés et/ou un peptide dérivé de la protéine de structure de HBV autre que l'antigène HBs et PreS. Dans ce cas, ces peptides peuvent être chimiquement ou enzymati-  
20 quement scindés pour les séparer en la séquence d'acides aminés de l'antigène HBV et la séquence d'acides aminés de l'autre peptide qui a été lié à l'antigène HBV. Alternative-  
25 ment, ces peptides fusionnés peuvent être utilisés tels  
30 quels en tant qu'antigène si l'antigénicité n'est pas affectée par la présence du peptide autre que l'antigène HBV.

L'antigène de la présente invention peut également être organo-chimiquement synthétisé en utilisant un synthétiseur automatique de peptide du commerce, etc. Par  
35 ailleurs, la reconception, la synthèse et la modification

dé l'antigène de la présente invention peuvent être facilement effectuées selon une méthode habituelle connue de technique des protéines.

L'antigène de la présente invention peut être  
5 utilisé en tant que constituant actif d'un vaccin de  
l'hépatite B. Le vaccin peut être préparé en ajoutant  
l'antigène de la présente invention à une solution iso-  
tonique stérilisée telle qu'une solution saline physio-  
10 logique ou un tampon de phosphate. Dans ce cas, il est  
préférable qu'une peptone, un acide aminé, un saccharide  
ou analogue, soit incorporé dans le vaccin en tant que stabi-  
lisant. Il est possible de fixer au préalable le présent  
antigène à la formaline. Le vaccin ainsi obtenu est sous  
15 une forme liquide. Mais le vaccin peut être reformulé en  
un vaccin adsorbé ou un vaccin en liposome par addition  
d'un adjuvant ou l'utilisation d'une membrane de phospho-  
lipide artificiel pour améliorer l'immunogénicité, ou en  
un vaccin lyophilisé qui est très stable et facile à trans-  
porter. Le vaccin contenant le présent antigène peut être  
20 formulé sous la forme de vaccins mélangés avec d'autres  
vaccins afin de réduire le prix et le labeur pour son  
administration. Par ailleurs, l'immunogénicité de l'antigène  
de la présente invention peut être être améliorée, par  
exemple, par introduction d'une chaîne de saccharides ou  
25 analogues à l'antigène par la technique de fusion moléculaire  
ou par modification, dans la cellule, après la translation.

Le vaccin contenant le présent antigène peut généra-  
lément être administré sous la forme d'un liquide ou d'une  
suspension. Dans le cas où le vaccin est un vaccin lyophili-  
30 sé, il est dissous ou mis en suspension dans la solution  
isotonique stérilisée ci-dessus mentionnée avant son  
administration. La concentration du présent antigène dans  
le vaccin pour une administration peut généralement être  
d'environ 0,001 à 1.000 µg/ml. En général, le vaccin peut  
35 être administré par voie sous-cutanée ou intramusculaire.

La dose du vaccin par adulte peut généralement être comprise entre 0,1 et 2,0 ml. En général, la dose du vaccin pour un enfant peut être égale à la moitié de celle du vaccin pour un adulte. Le vaccin peut généralement être administré deux fois à un intervalle d'environ une semaine à un mois puis être administré une fois de plus environ un semestre plus tard.

L'antigène de la présente invention peut également être utilisé en tant que diagnostic immunologique pour la détection d'infections du virus de l'hépatite B et pour déterminer si les patients souffrent ou non de l'hépatite. Par exemple, l'antigène de la présente invention est utile pour une utilisation dans ELISA, test de réaction d'hémagglutination passive inverse et divers autres tests où un antigène ou anticorps marqué d'un pigment fluorescent, une enzyme, un radio-isotope etc. sont respectivement utilisés.

L'antigène de la présente invention peut être utilisé pour détecter et identifier un anticorps anti-HBV en utilisant les diverses méthodes ci-dessus mentionnées de test.

L'antigène de la présente invention peut également être utilisé pour la production d'un anticorps contre le présent antigène. L'anticorps ainsi produit peut être avantageusement utilisé pour la détection et l'identification d'un antigène HBV en utilisant les méthodes ci-dessus mentionnées de test. La production d'un tel anticorps peut être effectuée par une méthode dans laquelle l'antigène de la présente invention est injecté à un animal de laboratoire pour forcer l'animal à produire un anticorps puis le sang ou fluide corporel de l'animal est recueilli. L'anticorps peut également être produit par une technique habituelle de fusion de cellules. Lorsque l'anticorps est produit par la première méthode, on obtient un anticorps polyclonal. Par ailleurs, lorsque l'anticorps est produit par la dernière

méthode, on obtient un anticorps monoclonal.

Par ailleurs, l'antigène de la présente invention ou bien l'anticorps contre le présent antigène peut être utilisé en tant que bio-séparateur, bioréacteur et bio-détecteur utilisant la réaction antigène-anticorps. Dans ce cas, l'antigène de la présente invention ou l'anticorps contre le présent antigène peut être fixé à un substrat ou support selon une méthode habituelle connue. Selon le but, l'antigène de la présente invention et l'anticorps contre le présent antigène peuvent être marqués par un pigment fluorescent, une enzyme, un radio-isotope ou analogue selon une méthode habituelle connue.

L'antigène de la présente invention a les avantages suivants.

La structure moléculaire du présent antigène est claire. Par conséquent, par l'utilisation du présent antigène, il est possible d'obtenir des préparations biologiques très efficaces, très sûres et uniformes comme un vaccin et des diagnostics très spécifiques et très efficaces. Par ailleurs, le présent antigène n'est pas produit par l'infection d'un animal par un virus mais est produit par l'expression génétique de l'ADN codant pour le présent antigène dans une cellule hôte. Par conséquent, la possibilité d'un danger biologique pendant les étapes de production du présent antigène est sensiblement éliminée. De même, le prix de production peut être diminué. Par ailleurs, comme la totalité des matériels, c'est-à-dire le milieu du système d'incubation, est connue pour sa composition et sa construction, la purification est facile et on peut obtenir un antigène produit de haute pureté.

La présente invention sera maintenant décrite en détail en se référant aux Exemples suivants, qui ne doivent pas être considérés comme limitant son cadre.

EXEMPLE 1Etape 1 [Purification des particules de Dane  
(particules de HBV)]

Des échantillons de sang ont été recueillis et  
 5 rassemblés de malades consultants souffrant de l'hépatite.  
 Le sérum a été obtenu du sang rassemblé, et a été soumis  
 à une détermination en utilisant une trousse de RIA  
 fabriquée et vendue par Abott Co., EUA, pour déterminer si  
 le sérum était positif à l'antigène HBe ou non. Le sérum  
 10 positif à l'antigène HBe a été recueilli. Le sérum a été  
 soumis à une centrifugation à 10.000 t/mn à 5°C pendant  
 10 minutes et l'on a recueilli le produit surnageant.  
 Subséquentement, le produit surnageant a été soumis à centri-  
 15 fugation à 28.000 t/mn et 5°C pendant 4 heures pour  
 précipiter les particules de Dane. Les particules de Dane  
 ont été recueillies et mises en suspension dans 10 ml d'un  
 tampon TNEMBSA [0,01 mole de Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mole  
 de NaCl, 0,001 mole de EDTA, 0,1% (poids/poids) de 2-  
 mercaptoéthanol et 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin].  
 20 La suspension ainsi obtenue a été mise en couches sur  
 TNEMBSA contenant 30% de saccharose, placée dans un tube  
 de centrifugeuse et soumise à centrifugation à 40.000 t/mn  
 à 5°C pendant 13 heures pour obtenir des précipités. Les  
 précipités résultants ont été mis en suspension dans 400 ml  
 25 d'un tampon TNEME (le même tampon que le tampon TNEMBSA  
 ci-dessus mentionné à l'exception qu'il ne contenait pas  
 d'albumine de sérum bovin), pour ainsi obtenir une suspension  
 purifiée de particules de Dane.

Etape 2 [Récupération de l'ADN de HBV réparé  
par l'ADN polymérase endogène]

30 A 50  $\mu$ l de la suspension purifiée de particules  
 de Dane, on a ajouté 150  $\mu$ l de TE [10 mmoles de Tris-HCl  
 (pH 8,0) et 0,1 mmole de EDTA] et 100  $\mu$ l d'une solution  
 [0,33 mole de Tris-HCl (pH 8,0), 0,125 mole de  $MgCl_2$ ,  
 35 0,4 mole de  $NH_4Cl$ , 0,4% (poids/poids) de NP-40, 0,5%

(poids/poids) de 2-mercaptoéthanol, 2 mmoles de dATP, 2 mmoles de dTTP, 0,5 mmole de dCTP, 0,5 mmole de dGTP, 3  $\mu$ moles d' $\alpha$ [ $^{32}$ P]dCTP et 3  $\mu$ moles d' $\alpha$ [ $^{32}$ P]dGTP ] .

On a permis au mélange résultant de réagir à 37°C pendant 2 heures. On a subséquemment ajouté, au mélange, 7,5  $\mu$ l de 10 mmoles de dCTP et 10 mmoles de dGTP, et on a laissé réagir à 37°C pendant 3 heures pour ainsi réparer la

portion à un seul brin de l'ADN de HBV par l'action de l'ADN polymérase endogène présente dans les particules de

Dane. On a ainsi obtenu un mélange qui contenait les particules de Dane contenant un ADN de HBV marqué [ $^{32}$ P] ayant une structure complètement à deux brins. Alors, on a

ajouté, au mélange ci-dessus obtenu, 30  $\mu$ l de 0,5 mole de EDTA (pH 8,0), 100  $\mu$ l de 5 mg/ml de protéase K et 50  $\mu$ l de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 10% (poids/poids),

et on a permis au mélange de réagir à 56°C pendant 2 heures. Alors, le mélange a été soumis trois fois à une extraction avec 550  $\mu$ l de phénol saturé d'eau pour obtenir un extrait. L'extrait a été appliqué à une colonne garnie de Sephadex

G-50 (fabriqué et vendu par Pharmacia Chemicals AB, Suède) et la fraction exempte a été recueillie. La fraction ainsi obtenue contenait l'ADN de HBV marqué [ $^{32}$ P] .

### Etape 3 [ Clonage de l'ADN de HBV ]

Une aliquote de la fraction contenant l'ADN de HBV obtenu à l'étape 2 a été soumise à une digestion par diverses enzymes de restriction pour analyser les sites de scission par endonucléase de restriction de l'ADN. Par suite, on a trouvé que l'ADN de HBV avait un site XhoI et un site BamHI en tant que sites de scission par endonucléase de restriction. En utilisant ces sites de scission par endonucléase, l'ADN de HBV a été cloné d'une manière décrite ci-dessous.

(A) Clonage au site XhoI du  $\lambda$  phage Charon 28

On a répété sensiblement les mêmes processus qu'à l'Etape 2 à l'exception que l'on n'a pas utilisé dCTP ni dGTP marqués, pour obtenir une fraction contenant l'ADN

de HBV. La fraction a été soumise à une précipitation dans l'éthanol pour former des précipités de l'ADN de HBV. Les précipités ont été recueillis et dissous dans 50  $\mu$ l d'un mélange de 10 mmoles de Tris-HCl, 7 mmoles de  $MgCl_2$ , 5 100 mmoles de NaCl et 7 mmoles de 2-mercaptoéthanol. On a ajouté, à la solution ainsi obtenue, une enzyme de restriction, XhoI avec ensuite incubation à 37°C pendant 1 heure pour scinder l'ADN de HBV par l'enzyme de restriction XhoI. Après la scission, le mélange a été soumis à une extraction 10 avec un volume égal de phénol saturé d'eau. A l'extrait résultant, on a ajouté un volume double d'éthanol froid et 1/10 du volume de 3 moles d'acétate de potassium (pH 4,8) et on a permis au mélange résultant de reposer à -20°C pendant 1 heure de manière que l'ADN précipite. Alors, le 15 mélange a été soumis à une centrifugation à 10.000 t/mn pendant 10 minutes pour recueillir l'ADN de HBV scindé par XhoI.

Sensiblement de la même manière qu'on l'a mentionné ci-dessus, l'ADN  $\lambda$  phage Charon 28 (ayant un site XhoI) 20 (fabriqué et vendu par Bethesda Research Laboratories, Inc., EUA) a été scindé par XhoI. L'ADN  $\lambda$  phage Charon 28 scindé résultant a été mélangé à l'ADN de HBV scindé par XhoI ci-dessus obtenu. Le mélange a été traité à l'ADN ligase T4 dans une solution contenant 67 mmoles de Tris-HCl 25 (pH 7,6), 6,7 mmoles de  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ g/ml de gélatine, 10 mmoles de dithiothréitol et 1 mmole de ATP à 12°C pendant 12 heures. Le mélange résultant a été soumis à une extraction avec un volume égal de phénol saturé d'eau, avec ensuite précipitation dans l'éthanol en utilisant une 30 volume double d'éthanol et 1/10 volume de 3 moles d'acétate de potassium pour ainsi obtenir des précipités. Les précipités ainsi obtenus ont été dissous dans 10  $\mu$ l d'un tampon TE pour obtenir une solution d'ADN contenant un ADN phagique recombinant.

Alors, en utilisant la solution d'ADN contenant l'ADN phagique recombinant, l'emballage in vitro de l'ADN phagique recombinant a été effectué par la méthode d'emballage in vitro [Methods in Enzymology (1978), 68, 299-309] en utilisant une trousse d'emballage in vitro de  $\lambda$ -ADN fabriquée et vendue par Takara Shuzo Co., Ltd., Japon) pour ainsi obtenir une particule de virus. Avec la particule de virus ainsi obtenue, des cellules de la souche DP50<sup>sup</sup> F de E. coli ont été transformées pour obtenir des transformants. Les transformants ont été inoculés sur un milieu d'agar L (1% poids/volume de bactotrypton, 0,5% poids/volume d'extrait de levure, 0,5% poids/volume de chlorure de sodium, 1,5% poids/volume d'agar, pH 7,2-7,4) avec ensuite incubation à 37°C pendant 6 heures pour ainsi former des plaques sur le milieu d'agar L. Alors, une hybridation des plaques a été effectuée en utilisant comme sonde l'ADN de HBV marqué <sup>32</sup>P, qui avait été obtenu à l'Etape 2, par la méthode décrite dans Manual for Genetic Engineering, Kodansha Scientific, pages 68-73, publié le 20 Septembre 1982, pour ainsi isoler les transformants contenant les phages recombinants porteurs de l'ADN de HBV scindé par XhoI (figure 1).

(B) Reclonage au site de BamHI du plasmide pBR322

Des cellules de la souche DP50<sup>sup</sup> F de Escherichia coli ont été infectées du phage recombinant contenant l'ADN de HBV scindé par XhoI obtenu à la sous-étape (A) ci-dessus, avec ensuite mise en culture pour multiplier l'ADN phagique recombinant dans les cellules de la souche de E. coli par la méthode décrite dans Manual for Genetic Engineering, pages 11-20. Alors, des cellules, l'ADN phagique recombinant a été isolé par la méthode d'extraction rapide à l'alcali [Nucleic Acid Research, 7 (6), 1513-1523 (1979)]. L'ADN phagique ainsi obtenu a été scindé par XhoI sensiblement de la même manière qu'on l'a décrit à la sous-étape (A) mentionnée ci-dessus, et a été soumis à une électrophorèse

sur 1% poids/volume d'agarose à faible point de fusion. Comme l'ADN de HBV a une longueur moléculaire d'environ 3,2 kb [ Nature , 317 , 489-495 (1985) ], une portion du gel correspondant à un poids moléculaire d'environ 3,2 kb a été découpée du gel. Au gel découpé, on a ajouté un volume quintuple d'un tampon TE, et on a chauffé le mélange à 65°C pour dissoudre le gel. La solution a été soumise à une extraction au phénol et une précipitation dans l'éthanol de la même manière qu'on l'a décrit à la sous-étape (A), pour obtenir l'ADN de HBV qui était sous une forme linéaire. L'ADN ainsi obtenu de HBV a été soumis à une réaction avec l'ADN ligase T4 dans les mêmes conditions que celles décrites à la sous-étape (A) pour former un ADN circulaire. Le mélange résultant a été soumis à une extraction au phénol et une précipitation dans l'éthanol de la même manière qu'on l'a décrit ci-dessus pour obtenir des précipités d'ADN circulaire et les précipités ainsi obtenus d'ADN circulaire ont été dissous dans une solution contenant 10 mmoles de Tris-HCl (pH 8,0, 7 mmoles de MgCl<sub>2</sub>), 100 mmoles de NaCl , 2 mmoles de 2-mercaptoéthanol et 0,01% d'albumine de sérum bovin. A la solution d'ADN circulaire ainsi obtenue, on a ajouté une enzyme de restriction BamHI pour scinder l'ADN circulaire. Alors, le mélange contenant l'ADN résultant a été soumis à une extraction au phénol et une précipitation dans l'éthanol sensiblement de la même manière qu'on l'a mentionné ci-dessus pour obtenir un ADN de HBV dont les deux extrémités avaient été scindées par BamHI.

Alors, le plasmide pBR322 a été scindé par BamHI sensiblement de la même manière qu'on l'a décrit ci-dessus, et le plasmide pBR322 scindé a été mélangé à l'ADN de HBV ci-dessus scindé par BamHI, et on a soumis le mélange à une réaction avec l'ADN ligase T4 dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, pour obtenir un ADN recombinant. En utilisant l'ADN recombinant ainsi obtenu,

des cellules de Escherichia coli X 1776 (ATCC 31244) ont été transformées selon la méthode décrite dans Molecular Cloning, pages 254-255 (1982), publié par Cold Spring Harbor Laboratory, pour ainsi obtenir des transformants. Les transformants ont été inoculés sur une plaque de milieu de test antibactérien 3 (fabriqué et vendu par Difco Laboratories, EUA) qui contenait 25 µg/ml d'ampicilline, avec ensuite mise en culture. Ainsi, le transformant un plasmide pBR322 ayant un ADN de HBV inséré à son site de BamHI s'est révélé présenter une résistance à l'ampicilline et une sensibilité à la tétracycline. Du transformant ainsi obtenu, on a extrait un ADN plasmidique par la méthode décrite dans "Molecular Cloning" ci-dessus mentionné, pages 368-369. L'ADN plasmidique a été scindé par une enzyme de restriction BamHI sensiblement de la même manière qu'on l'a décrit ci-dessus. L'ADN scindé résultant a été soumis à l'hybridation de la tache du Sud par la méthode décrite dans le "Manual for Genetic Engineering" ci-dessus mentionné, pages 73-80 en utilisant, comme sonde, l'ADN de HBV marqué <sup>32</sup>P obtenu à l'Etape 2, et on a pu confirmer le clonage de l'ADN de HBV d'environ 3,2 kb. Le plasmide ainsi obtenu a été désigné par pM1B11 (voir figure 1). Par ailleurs, le transformant contenant le plasmide pM1B11 a été désigné par E. coli X 1776/pM1B11 et déposé au Fermentation Research Institute, au Japon, sous le n° d'accession FERM 8P-1081.

Etape 4 [ Construction d'un plasmide capable d'exprimer l'ADN de HBV pour produire l'antigène HBV et sa modification ]

Le plasmide pM1B11 obtenu à l'Etape 3 a été digéré par les enzymes de restriction XhoI et BamHI pour obtenir un fragment d'ADN d'environ 1,3 kb contenant un ADN codant pour l'antigène HBs. Par ailleurs, le plasmide pPH05 obtenu selon la méthode décrite dans Kenji Arima et autres, Nucl. Acid Res., 11, 1657, 1983 a été digéré par les enzymes de

restriction BamHI et Sali pour obtenir un fragment d'ADN d'environ 0,6 kb contenant un promoteur PH05. Par ailleurs, les deux types ci-dessus mentionnés de fragments d'ADN ont été ligaturés l'un à l'autre par l'utilisation d'une ADN ligase T4. Alors, l'ADN ligaturé a été scindé par l'enzyme de restriction BamHI pour obtenir un fragment d'ADN de 1,9 kb ayant le promoteur PH05 et un gène codant pour HBs. Alors, le fragment ainsi obtenu d'ADN a été mélangé à un fragment d'ADN préparé par digestion du plasmide pBR325 par l'enzyme de restriction BamHI la phosphatase alcaline, et on a permis au mélange résultant de réagir avec l'ADN ligase T4 pour obtenir un plasmide ayant une structure telle que le fragment d'ADN contenant PH05 et . lié à son extrémité en aval, un gène codant pour l'antigène HBs, soit inséré au site BamHI du plasmide pBR325. Alors, le plasmide résultant a été digéré par une enzyme de restriction KpnI, et encore digéré par l'exonucléase Bal31. On a ainsi obtenu un mélange contenant des clones plasmidiques dépourvus du codon ATG d'initiation du gène de structure de PH05, lesquels clones avaient diverses longueurs moléculaires. Ces clones plasmidiques dans le mélange ont été digérés par l'enzyme de restriction BamHI, et insérés séparément au site de BamHI du plasmide YEp13 (ATCC 37115) pour obtenir un mélange de séries de plasmides d'expression. La série des plasmides a été désignée par série pBH103 (voir figure 2).

Etape 5 [ Transformation d'une levure par la série de plasmides d'expression pBH103 et isolement d'une levure transformée ]

Les cellules de la souche de levure Saccharomyces cerevisiae SHY4 (ATCC N° d'Accession 44772) ont été transformées par la série de plasmides d'expression pBH103 selon la méthode des cations alcalins. A titre d'exemple, la levure a été mise en culture dans un milieu YPD (2% poids/volume de bactopeptone, 1% poids/volume d'extrait de levure,

2% poids/volume de dextrose), et on a centrifugé 5 ml de la culture à 2.500 t/mn pendant 5 minutes pour récolter des cellules. Les cellules ont été mises en suspension dans 5 ml d'un tampon TE et centrifugées à 2.500 t/mn pendant 5 minutes pour récolter les cellules. Les cellules ont été remises en suspension dans 9,6 ml du tampon TE pour obtenir une suspension. A 0,5 ml de la suspension, on a ajouté 0,5 ml de 0,2 mole d'acétate de lithium et on a incubé à 30°C pendant 60 minutes. Alors, à 0,1 ml de la culture résultante, on a ajouté 7 µl du mélange ci-dessus obtenu de la série de plasmides d'expression et on a incubé à 30°C pendant 30 minutes. A la culture résultante, on a ajouté 0,1 ml de 70% poids/volume de polyéthylène glycol 4000 et on a incubé à 30°C pendant 60 minutes. Alors, on a ajouté, à la culture, 2 ml d'eau distillée avec ensuite centrifugation à 2.500 t/mn pendant 5 minutes pour récolter des cellules. Les cellules ont été mises en suspension dans une petite quantité d'eau distillée et inoculées à un milieu d'agar SD [0,67% poids/volume de bactolevure (base d'azote, sans acide aminé) (fabriquée et vendue par Difco Laboratories, EUA), 2% poids/volume de dextrose, 20 µg/ml d'uracil, 20 µg/ml de L-tryptophane, 20 µg/ml de L-histidine, 2% poids/volume d'agar] qui était un milieu sélectif ne contenant pas de leucine. Le milieu d'agar résultant a été incubé à 30°C pour former des colonies. Les colonies ont été isolées pour obtenir des levures transformées.

Etape 6 [ Incubation des levures transformées et extraction d'un antigène ]

Chacune des levures transformées obtenues à l'étape 5 a été inoculée à un milieu de Burkholder qui est un milieu complètement synthétique contenant 1,5 g/l de phosphate monobasique de potassium, 20 µg/ml d'uracil, 20 µg/ml de L-tryptophane et 20 µg/ml de L-histidine (voir Burkholder P.R. et autres, Am. J. Botany, 30, 206, 1943) et on a incubé tout en agitant à 30°C pendant 24 heures.

Après l'incubation, la culture a été centrifugée à 2.500 t/mn pendant 5 minutes pour récolter des cellules. Les cellules ont été lavées une fois à l'eau distillée, inoculées à un milieu de Burkholder qui contenait 1,5 g/l de chlorure de potassium à la place du phosphate de potassium monobasique ci-dessus mentionné et incubées tout en agitant à 30°C pendant 24 heures. Après l'incubation, les cellules ont été récoltées par centrifugation, lavées et mises en suspension dans 50 mmoles d'un tampon de phosphate (pH 7,2). Des perles de verre (d'un diamètre de 0,45-0,55 mm) ont été placées dans la suspension, et on a vigoureusement secoué pour interrompre les cellules. La suspension résultante a été centrifugée à 10.000 t/mn pendant 10 minutes, pour séparer en un produit surnageant et une boulette de cellules. Le produit surnageant a été recueilli. On a ainsi obtenu un extrait de levure.

Etape 7 [ Mesure de la quantité de l'antigène produit par la levure transformée ]

Une détermination quantitative de l'antigène dans l'extrait de levure obtenu à l'étape 6 a été effectuée en utilisant Auslia II, trousse du commerce de mesure de l'antigène HBs (fabriquée et vendue par Abott Co., EUA). La mesure de la quantité de l'antigène produit par chacune des levures transformées obtenues à l'étape 5 a montré que l'une des levures, qui avait un plasmide désigné par pBH103-ME5, produisait une forte quantité de l'antigène. De même, une levure ayant un plasmide désigné par pBH103-CT présentait une propriété de production de l'antigène. Les résultats sont montrés au Tableau 1.

Tableau 1

Plasmide possédé par la levure transformée	Quantité de l'antigène produit par la levure transformée (ng/ml)
pBH 103-MES	953
pBH 103-C†	184

5

10

Etape 8 [ Détermination de la séquence des bases d'ADN du promoteur PH05 et gène de structure codant pour l'antigène du plasmide pBH103-ME5 ]

15

Le plasmide pBH103-ME5 a été scindé par divers types d'enzymes de restriction pour obtenir des fragments d'ADN. Les fragments d'ADN ont été insérés dans un plasmide pUC12 [ Messing , J., "Methods in Enzymology", 101, partie C, 20 (1983) ], avec ensuite détermination des séquences des bases du promoteur PH05 et de l'ADN codant pour l'antigène porté par le plasmide pBH103-ME5 par la méthode de terminaison de chaîne au didésoxy [ Sanger , F. et autres, Proc Natl. Acad. Sci., EUA, 74, 5463 (1977); Hattori, M. et autres, Anal. Biol., 152, 232 (1986) ]. Les résultats sont montrés à la figure 3.

20

25

Par la séquence des bases montrée à la figure 3, on a trouvé que l'antigène codé par le gène de structure avait une séquence d'acides aminés consistant en la séquence de 226 acides aminés codant pour l'antigène HBs et, liée à son extrémité N, une séquence de 9 acides aminés correspondant à la séquence d'acides aminés C-terminale de PreS ainsi qu'un résidu de méthionine dérivé d'un codon d'initiation ATG (voir figure 3). La levure transformée contenant le plasmide pBH103-ME5 a été désignée par SHY4/pBH103-ME5.

30

Par ailleurs, la séquence des bases du promoteur PH05 et du gène de structure codant pour l'antigène porté par le plasmide pBH103-CT a également été déterminée sensiblement de la même manière qu'on l'a mentionné ci-dessus.

5 Les résultats sont également montrés à la figure 3. De la séquence des bases montrée à la figure 3, on a trouvé que l'antigène codé par le gène de structure porté par le plasmide pBH103-CT avait une séquence d'acides aminés consistant en 226 acides aminés de l'antigène HBs (voir  
10 figure 3). La levure transformée contenant le plasmide pBH103-CT a été désignée par SHY4/pBH103-CT.

Etape 9 [ Identification et détermination du poids moléculaire de l'antigène produit par la levure transformée SHY4/pBH103-ME5 ]

15 Sensiblement de la même manière qu'on l'a décrit à l'étape 6, la levure transformée SHY4/pBH103-ME5 a été mise en culture, et l'on a obtenu un extrait de la culture résultante. A l'extrait, on a ajouté 2% (poids/volume) de charbon activé. Le mélange résultant a été soumis à  
20 agitation à température ambiante pendant 30 minutes avec ensuite centrifugation à 3.000 t/mn pendant 10 minutes pour obtenir un produit surnageant. Le produit surnageant a été concentré par ultrafiltration. Le concentré résultant a été disposé en couches sur une solution de saccharose ayant  
25 un gradient de densité de saccharose de 20-50% (poids/volume), avec ensuite centrifugation à 20.000 t/mn pendant 20 heures. Le mélange ainsi obtenu a été fractionné et soumis à une détermination de la quantité de l'antigène sensiblement de la même manière qu'à l'étape 7. Par suite,  
30 on a trouvé que l'antigène était contenu dans une fraction ayant une densité de saccharose d'environ 35%. Cette fraction a été dialysée avec 50 mmoles d'un tampon de phosphate (pH 7,2) et, au dialysat résultant, on a ajouté CsCl en une quantité telle que la densité du mélange  
35 résultant soit de 1,2. Le mélange a été soumis à une

céntrifugation à 42.000 t/mn pendant 40 heures. Le mélange résultant a été fractionné et soumis à une détermination de la quantité de l'antigène sensiblement de la même manière qu'à l'étape 7. Par suite, on a trouvé que l'antigène était contenu dans une fraction ayant une densité de 1,21. La solution ainsi purifiée de l'antigène a été soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Après accomplissement de l'électrophorèse, le gel a été prélevé et les protéines sur le gel ont été maculées sur un film de nitrocellulose. Le film résultant de nitrocellulose a été soumis à une réaction avec un sérum de chèvre anti-HBs humain (fabriqué et vendu par DAKO Co., Ltd, EUA), marqué au peroxydase de raifort (HRPO) avec ensuite réaction de développement de couleur en utilisant le 4-chloroindo-naphtol afin de détecter l'antigène. On a par suite détecté une bande de l'antigène à la position correspondant à une longueur moléculaire de 24 kilodaltons (kd) (voir figure 4). A la figure 4, la voie gauche (A) montre le résultat de l'électrophorèse de l'antigène purifié de la présente invention et la voie droite (B) montre le résultat de l'électrophorèse d'un extrait de levure obtenu des cellules de levure parentes (témoin).

Par ailleurs, en utilisant le sérum de chèvre anti-HBs humain (fabriqué et vendu par DAKO Co, Ltd, EUA), l'antigène HBs dérivé du sang humain et l'antigène purifié ci-dessus mentionné de la présente invention, on a entrepris une détermination par précipitation à la manière suivante. On a versé séparément 50 µl de l'antisérum ci-dessus mentionné, 50 µl de l'antigène HBs dérivé de sang humain et 50 µl de l'antigène purifié de la présente invention, dans 3 trous (qui étaient agencés en une relation telle qu'un triangle imaginaire formé par les trous au sommet soit un triangle régulier), sur un gel à 0,8% (poids/volume) d'agarose. On a permis au gel de reposer pendant toute une nuit à température ambiante. Alors, les lignes de précipitine

formées par les réactions entre les antigènes et l'antisérum ont été observées. Par suite, on a trouvé que la ligne de précipitine formée par la réaction entre l'antisérum et l'antigène HBs dérivé du sang humain et la ligne de précipitine formée par la réaction entre l'antisérum et l'antigène purifié de la présente invention étaient totalement fondues. Ce résultat indique que l'antigène purifié de la présente invention et l'antigène HBs dérivé du sang humain sont identiques en ce qui concerne l'antigénicité .

Etape 10 [ Détermination de l'immunogénicité de l'antigène produit par la levure transformée SHY4/pBH103-ME5 ]

On a répété sensiblement les mêmes processus qu'à l'étape 9 pour obtenir un antigène purifié de la présente invention. Alors, selon les standards de préparation d'un vaccin adsorbé pour l'hépatite B, qui sont indiqués dans "Minimum Requirements for Biological Products" (Notification N° 159 du Ministère de la Santé et du Bien Public du Gouvernement Japonais), on a préparé un vaccin pour l'hépatite B à partir du présent antigène , comme suit. Le présent antigène a été dissous dans une solution saline physiologique pour obtenir une solution contenant 40 µg/ml de l'antigène purifié ci-dessus décrit. A la solution, on a ajouté un volume égal d'une solution saline physiologique contenant 0,4 mg/ml d'hydroxyde d'aluminium , avec ensuite mélange. On a ainsi préparé un vaccin adsorbé sur l'aluminium, pour l'hépatite B. On a inoculé , par voie sous-cutanée, 1 ml du vaccin préparé, au dos de 10 souris BALB/c âgées de 5 semaines. Cinq semaines après l'inoculation, des échantillons de sang ont été recueillis des souris, et soumis à un test d'hémagglutination passive pour déterminer le titre d'anticorps dans les échantillons de sang. Les résultats sont montrés au Tableau 2.

Tableau 2

Vaccin	titre d'antigène relatif
5 Lot y003 <sup>1)</sup>	1,76
Produit de référence <sup>2)</sup>	1,0

Note : 1) : vaccin de la présente invention  
10 2) : "vaccin adsorbé de référence pour l'hépatite B"  
utilisé pour l'essai de titration, obtenu du  
National Institute of Health , Japon.

## R E V E N D I C A T I O N S

1.- Antigène du virus de l'hépatite B, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) qui suit :

5 Met Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn  
 Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly  
 Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe  
 Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln  
 Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn  
 10 Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly  
 Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro  
 Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe  
 Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys  
 15 Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr  
 Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu  
 Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro  
 Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly  
 Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
 20 Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile  
 Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg  
 Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe  
 Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val  
 Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val  
 25 Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr  
 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser  
 Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe  
 Cys Leu Trp Val Tyr Ile  
 . . . . . (I).

30 2.- Antigène selon la revendication 1, caractérisé en ce que c'est un peptide fusionné comprenant la séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) précitée et

une séquence d'acides aminés d'un peptide autre que l'antigène ayant ladite séquence d'acides aminés représentée par la formule (I), qui lui est liée à son extrémité C et/ou son extrémité N.

5           3.- Acide désoxyribonucléique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence de bases codant pour l'antigène du virus de l'hépatite B selon la revendication 1.

10           4.- Acide désoxyribonucléique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence de bases choisie dans le groupe consistant en une séquence de bases représentée par la formule (II) qui suit et une séquence complémentaire à ladite séquence de bases :

          ATG TCG AGG ACT GGG GAC CCT GCA CCG AAC  
          ATG GAG AAC ACA ACA TCA GGA TTC CTA GGA  
15       CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC  
          TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCA CAG  
          AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT  
          TTT CTA GGG GGA GCA CCC ACG TGT CCT GGC  
          CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC  
20       TCA CCA ACC TCT TGT CCT CCA ATT TGT CCT  
          GGC TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT  
          ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC  
          CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAC  
          CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA CTT  
25       CCA GGA ACA TCA ACT ACC AGC ACG GGA CCA  
          TGC AAG ACC TGC ACG ATT CCT GCT CAA GGA  
          ACC TCT ATG TTT CCC TCT TGT TGC TGT ACA  
          AAA CCT TCG GAC GGA AAC TGC ACT TGT ATT  
          CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GCA AGA  
30       TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC  
          TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT  
          CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT  
          TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT  
          TGG GGG CCA AGT CTG TAC AAC ATC TTG AGT

CCC TTT TTA CCG CTA TTA CCA ATT TTC TTT  
TGT CTT TGG GTA TAC ATT

. . . . . (II).

5.- Acide désoxyribonucléique caractérisé en ce  
5 qu'il comprend une séquence de bases qui est celle obtenue  
par substitution d'au moins une base de ladite au moins  
une séquence de bases de l'acide désoxyribonucléique selon  
la revendication 4, selon la dégénération du code génétique.

6.- ADN recombinant réplifiable, caractérisé en ce  
10 qu'il comprend un acide désoxyribonucléique selon la  
revendication 3 et un vecteur d'expression réplifiable.

7.- Micro-organisme ou culture de cellules,  
caractérisé en ce qu'il est transformé par un ADN recombi-  
nant réplifiable selon la revendication 6.

15 8.- Procédé de production d'un antigène du virus  
de l'hépatite B comprenant une séquence d'acides aminés  
selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) la ligature d'un acide désoxyribonucléique  
comprenant une séquence de bases codant pour ledit antigène  
20 à un vecteur d'expression réplifiable pour obtenir un ADN  
recombinant réplifiable comprenant ledit acide désoxy-  
ribonucléique et ledit vecteur d'expression réplifiable.

b) la transformation des cellules d'un micro-  
organisme ou de la culture de cellules par ledit ADN  
25 recombinant réplifiable pour former des transformants;

c) la sélection desdits transformants de cellules  
parentes du micro-organisme ou de la culture de cellules;

d) l'incubation desdits transformants, forçant  
lesdits transformants à exprimer ledit acide désoxy-  
30 ribonucléique et à produire un antigène; et

e) l'isolement dudit antigène et des transformants  
incubés.

9.- Vaccin pour le virus de l'hépatite B caractérisé  
en ce qu'il comprend :

35 une quantité immunogène efficace d'un antigène du

virus de l'hépatite B selon la revendication 1; et  
au moins un véhicule, diluant ou excipient  
acceptable en pharmacie.

10.- Souche X 1776/pM1B11 du micro-organisme  
5 Escherichia coli, caractérisée en ce qu'elle est déposée  
au fermentation Research Institute sous le N° d'accession  
FERM BP-1081.

11.- Plasmide pM1B11 caractérisé en ce qu'il est  
obtenu par reclonage au site BamHI du plasmide pBR322.

FIG. 1

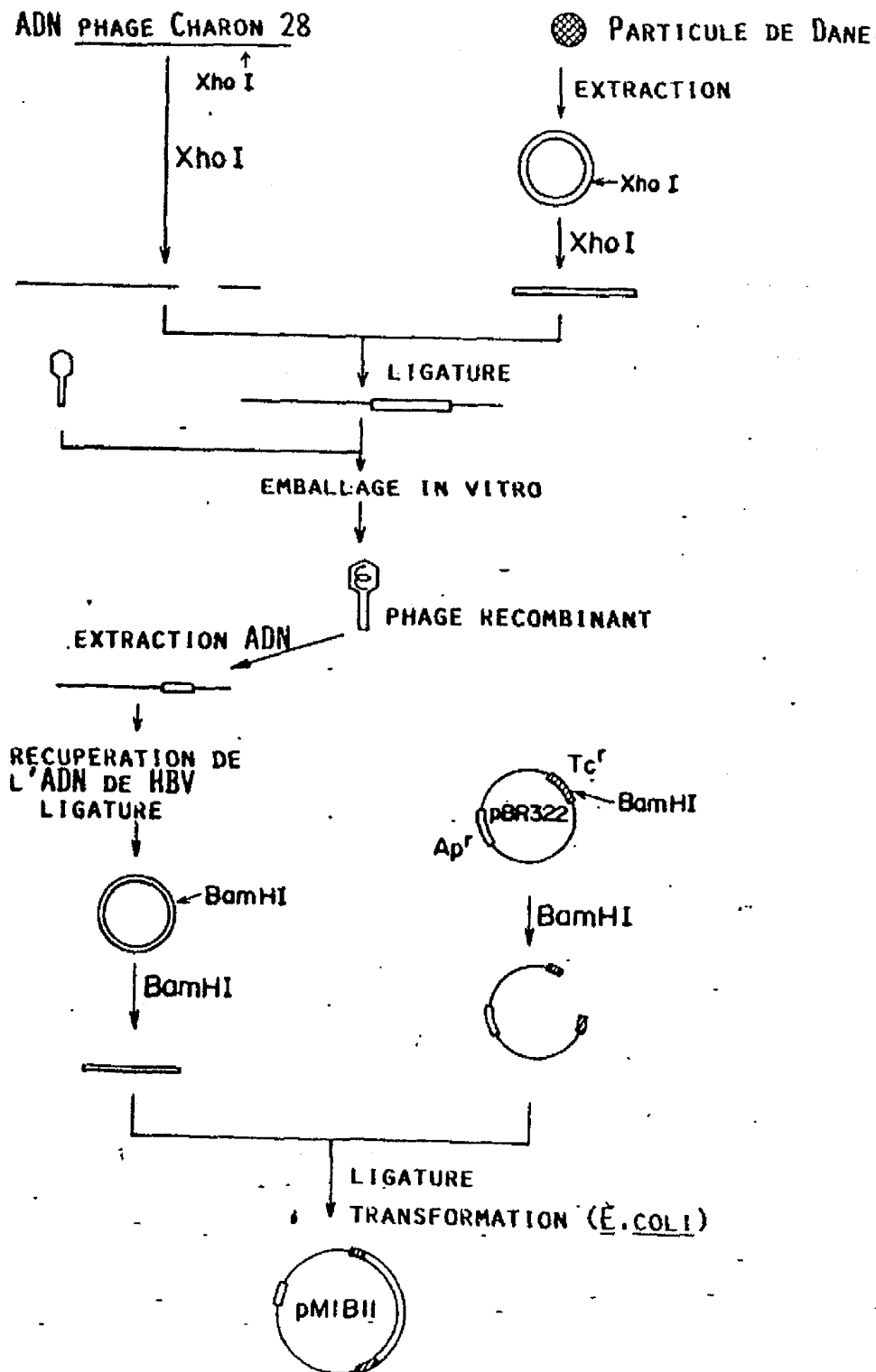
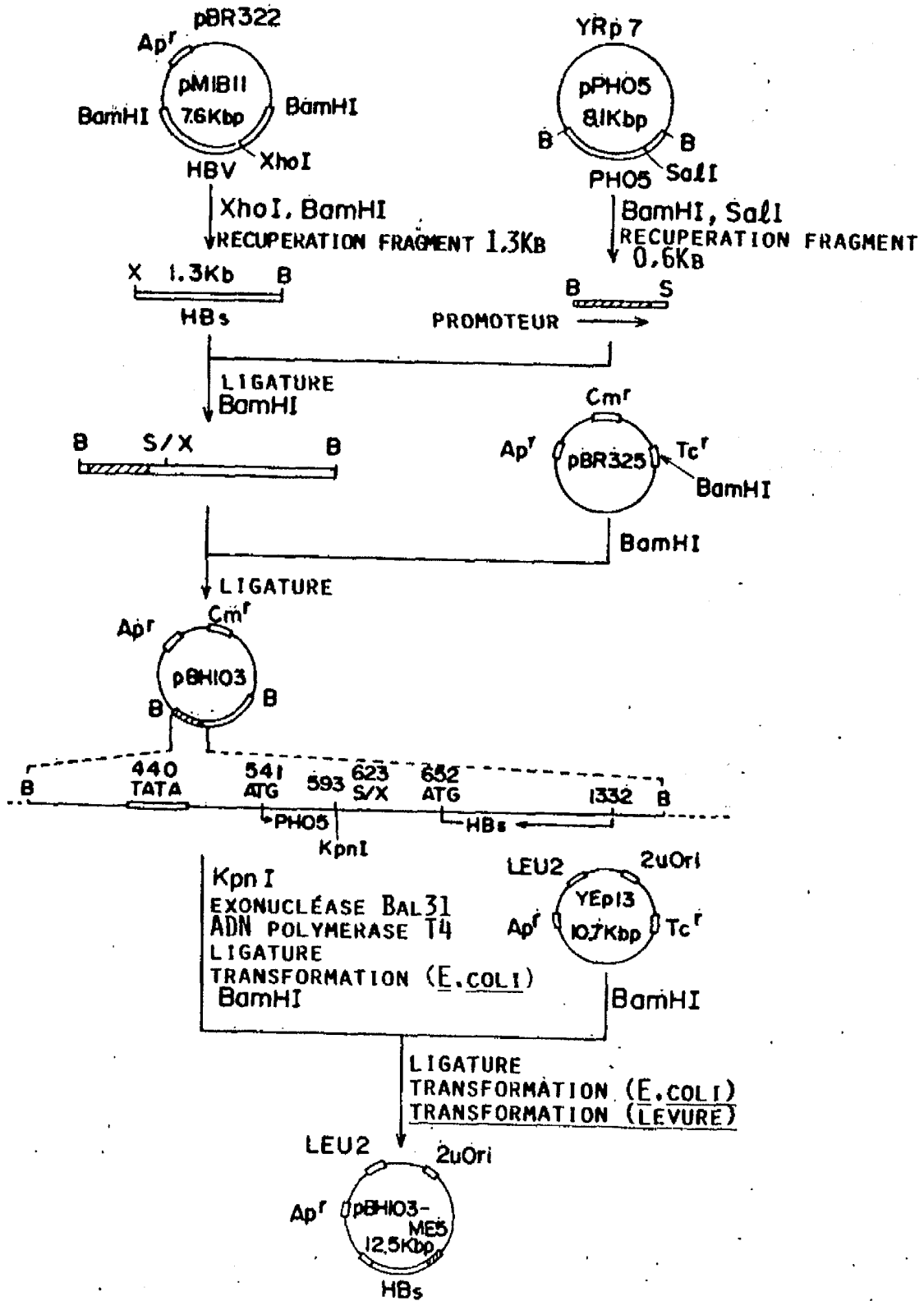


FIG. 2



# FIG. 3a

-87  
Case de Hogness  
-89

PBH103-MES : ----- ATACCCATTGGGATAAGGGTAAACATCTTTGAAATTTGTGAAATGAACGTAIAIAAG.  
PBH103-CT : ----- ATACCCATTGGGATAAGGGTAAACATCTTTGAAATTTGTGAAATGAACGTAIAIAAG

CGCTGATGTTTTGGCTAAGTCGAGGTTAGTATGGCTTCATCTCATGAGATAAGAACAAACAATAGAGCTAGCCG  
CGCTGATGTTTTGGCTAAGTCGAGGTTAGTATGGCTTCATCTCATGAGATAAGAAC-----

1 ATG TCG AGG ACT GGG GAC CCT GCA CCG AAC ATG GAG AAC ACA ACA TCA GGA TTC CTA GGA 60  
Met Ser Arg Thr Thr Gly Asp PFO Ala PFO Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly  
--- -GG ACT GGG GAC CCT GCA CCG AAC ATG GAG AAC ACA ACA TCA GGA TTC CTA GGA 30  
Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly 30  
1

# FIG. 3b

CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC TTT TTTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCA CAG	90	120
Pro Leu Leu Val Leu Val Leu Gln Ala Gln Ala Gly Phe Phe Phe	60	Gln
CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC TTT TTTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCA CAG		90
Pro Leu Leu Val Leu Val Leu Gln Ala Gln Ala Gly Phe Phe Phe		Gln
AGT CTA GAC TCG TGG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TTT CTA GGG GGA GCA CCC ACC TGT. CCT GGC	150	180
Ser Leu Asp Ser Trp Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly		Gly
AGT CTA GAC TCG TGG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TTT CTA GGG GGA GCA CCC ACC TGT CCT GGC		Gly
Ser Leu Asp Ser Trp Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly		Gly
CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT TCC AAT CAC TCA CCA ACC TCT TGT TGT CCT CCT	210	240
Gln Asn Ser Gln Ser Pro Pro Thr Ser Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Ile Cys Pro		Pro
CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC TCA CCA ACC TCT TGT TGT CCT CCT		Pro
Gln Asn Ser Gln Ser Pro Pro Thr Ser Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Ile Cys Pro		Pro

## FIG. 3c

GGC TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT ATA ATA TTC CTC TTC ATC ATC CTG CTG CTA CTA TGC  
 GLY TYR ARG TRP MET CYS LEU ARG ARG PHE ILE ILE PHE LEU PHE ILE LEU LEU LEU LEU CYS  
 GGC TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT ATC ATA TTC CTC TTC ATC ATC CTG CTG CTA TGC  
 GLY TYR ARG TRP MET CYS LEU ARG ARG PHE ILE ILE PHE LEU PHE ILE LEU LEU CYS 270

CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAC CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA CTT  
 LEU ILE PHE LEU LEU VAL LEU LEU ASP TYR GIN GIN GLY MET LEU PRO VAL CYS PRO LEU LEU  
 CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAC CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA CTT  
 LEU ILE PHE LEU LEU VAL LEU LEU ASP TYR GIN GIN GLY MET LEU PRO VAL CYS PRO LEU LEU 330

CCA GGA ACA TCA ACT ACC AGC ACG GGA CCA TGC AAG ACC TGC ACG ATT CCT GCT CAA GGA  
 PRO GLY THR SER THR THR ACC ACC AGC ACG GGA CCA TGC CYS LYS THR CYS THR ILE PRO ALA GIN GLY  
 CCA GGA ACA TCA ACT ACC ACC AGC ACG GGA CCA TGC AAG ACC TGC ACG ATT CCT GCT CAA GGA  
 PRO GLY THR SER THR THR ACC ACC AGC ACG GGA CCA TGC CYS LYS THR CYS THR ILE PRO ALA GIN GLY 390

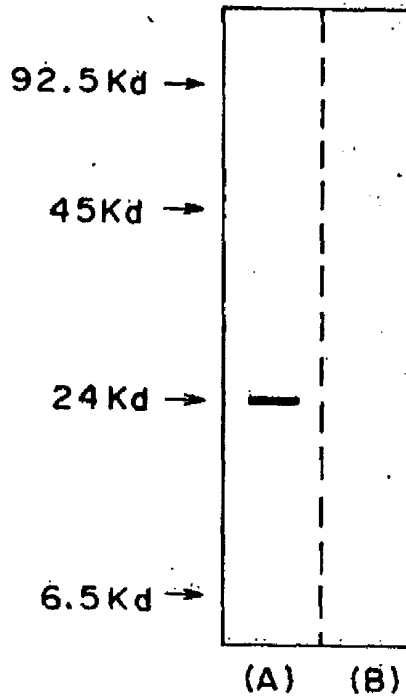
## FIG. 3d

ACC TCT ATG TTT CCC TCT TGT TGC TGT TGT TGC TGT TGT TGC ACT TGT ATT	AAA CCT TCG GAC GGA AAC TGC ACT TGC ACT TGT ATT	480
Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys TGT TGC TGT TGC TGT TGC ACT TGT ATT	Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile	480
ACC TCT ATG TTT CCC TCT TGT TGC TGT TGT TGC TGT TGT TGC ACT TGT ATT	AAA CCT TCG GAC GGA AAC TGC ACT TGC ACT TGT ATT	480
Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys TGT TGC TGT TGC TGT TGC ACT TGT ATT	Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile	450
420		
CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC	540
Pro Ile Pro Ser Trp Trp Ala Phe Ala Phe Ala Phe Ala Phe Ala Phe	Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe	540
CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC	540
Pro Ile Pro Ser Trp Trp Ala Phe Ala Phe Ala Phe Ala Phe	Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe	510
480		
TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT	600
Ser Trp Leu Ser Leu Val Pro Phe Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val	Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val	600
TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT	600
Ser Trp Leu Ser Leu Val Pro Phe Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val	Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val	570
570		
540		

FIG. 3e

TGG	CTT	TCA	GTT	ATA	TGG	ATG	ATG	TGG	TAT	TGG	TAT	TGG	GGG	CCA	AGT	CTG	TAC	AAC	ATC	TTG	AGT	660
Trp	Leu	Ser	Val	Ile	Trp	Met	Trp	Trp	Tyr	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	
TGG	CTT	ICA	GTT	ATA	TGG	ATG	ATG	TGG	TAT	TGG	TAT	TGG	GGG	CCA	AGT	CTG	TAC	AAC	ATC	TTG	AGT	
Trp	Leu	Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	630
CCC	TTT	TTA	CCG	CTA	TTA	CCA	ATT	TTC	TTT	TGT	CTT	TGG	GTA	TAC	ATT	TAC	ATT	:708	nucl	690		
Pro	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile	Ile	:236	amino	660			
CCC	TTT	TTA	CCG	CTA	TTA	CCA	ATT	TTC	TTT	TGT	CTT	TGG	GTA	TAC	ATT	TAC	ATT	:678	nucl			
Pro	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile	Ile	:226	amino				

FIG. 4





## ABSENCE D'UNITE D'INVENTION

La présente demande ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir

1. Revendications :

2. Revendications :

3. Revendications :

4. Revendications :

Le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée dans les revendications:

## ETENDUE DE LA RECHERCHE

Compte tenu des documents considérés comme pertinents, le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications, à savoir les revendications :

Les éléments figurant dans les

1. Revendications :

2. Revendications :

3. Revendications :

4. Revendications :

n'ont pas été pris en considération que dans le cadre de la recherche relative aux caractéristiques de l'invention ou de la pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications



Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE**

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale  
Page 2

BE 8700666  
BO 325

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	BIOTECHNOLOGY, vol. 3, avril 1985, pages 317-320; P. VALENZUELA et al.: "Synthesis and assembly in yeast of hepatitis B surface antigen particles containing the polyalbumin receptor" * Page 317, colonne 2, lignes 23-39; page 318 *	1-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 11, no. 13, juillet 1983, pages 4601-4610, IRL Press Ltd, Cambridge, GB; A. FUJIYAMA et al.: "Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr" * Figure 2 *	1-11	
D,Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 11, no. 6, 1983, pages 1657-1672, Oxford, GB; K. ARIMA et al.: "The nucleotide sequence of the yeast PHO5 gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide" * Figure 4 *	1-11	
A	NATURE, vol. 317, no. 6037, octobre 1985, pages 489-495, Londres, GB; P. TIOLLAIS et al.: "The hepatitis B virus"		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15-12-1987		SKELLY J.M.	
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : arrière-plan technologique  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P0448)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.

BE 8700666  
BO 325

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/01/88

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0020251	10-12-80	JP-A- 56063995	30-05-81
EP-A- 0171908	19-02-86	WO-A- 8600640 WO-A- 8601534 WO-A- 8603411 WO-A- 8607384	30-01-86 13-03-86 19-06-86 18-12-86
EP-A- 0174444	19-03-86	Aucun	
EP-A- 0182442	28-05-86	EP-A, B 0013828 US-A- 4710463	06-08-80 01-12-87
EP-A- 0105149	11-04-84	JP-A- 59031799 EP-A- 0103201 AU-A- 1800283 JP-A- 59036699 AU-A- 1800383	20-02-84 21-03-84 23-02-84 28-02-84 23-02-84

EPO FORM P0463

■ Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82