



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 584**

51 Int. Cl.:
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04738948 .1**
96 Fecha de presentación : **24.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1641819**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Purificación de variantes de HER-2.**

30 Prioridad: **25.06.2003 DK 2003 00954**
25.06.2003 US 482315 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.09.2009

73 Titular/es: **BN ImmunoTherapeutics, Inc.**
2425 García Avenue
Mountain View, California 94043, US

72 Inventor/es: **Eskling, Marie y**
Nielsen, Klaus Gregorius

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Purificación de variantes de HER-2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a esquemas de purificación específicos adecuados para variantes de proteínas marcadas con histidina derivadas del antígeno HER-2 asociado al cáncer.

10 Adicionalmente, la presente invención se refiere a una variante inmunógena de HER-2 humano que es capaz de generar una respuesta inmune en humanos, y que está direccionada también a la molécula HER-2 humana nativa.

Antecedentes de la invención

15 La proteína de membrana HER-2 asociada al cáncer es un miembro de la familia de proteínas EGFR. Esta proteína particular ha hecho concebir esperanzas como inmunógeno en inmunoterapia activa específica de ciertos cánceres, particularmente cáncer de mama y cáncer colorrectal.

20 El cesionario de la presente solicitud de patente ha presentado con anterioridad solicitudes de patente relativas a la vacunación activa contra el antígeno HER-2, véase WO 00/20027. Investigaciones ulteriores en este campo han identificado ahora variantes de HER-2 preferidas para tales vacunas, pero un problema general en la química de las proteínas estriba en idear medios mejorados para la obtención de rendimientos satisfactorios de proteína recombinante con un alto grado de pureza.

25 La cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) fue introducida por primera vez por Porath (Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage [1975] *Nature* 258:598:599) bajo el término cromatografía de quelatos metálicos y ha sido revisada previamente en varios artículos (Porath, J. [1992] *Protein Purification and Expression* 3:263-281; y artículos citados en dicho lugar). El proceso de purificación IMAC está basado en el empleo de una matriz formadora de quelatos cargada con iones metálicos blandos tales como Cu^{2+} y Ni^{2+} . Grupos donantes de electrones en la superficie de las proteínas, especialmente la cadena lateral imidazol de la histidina, pueden fijarse a los sitios no coordinados del metal cargado. La interacción entre el grupo donante de electrones con el metal puede hacerse reversible por disminución del pH o por desplazamiento con imidazol. De este modo, puede purificarse una proteína que posea grupos donantes de electrones tales como histidina por interacciones reversibles complejo metálico/proteína.

35 En 1991, Ford *et al.* (Ford, C., I. Suominen, C. Glatz [1991] *Protein Expression and Purification* 2:95-107) describieron la purificación de proteínas utilizando tecnología IMAC (ligando Ni-NTA) aplicada a proteínas recombinantes que tienen colas con residuos histidina (proteínas recombinantes polihistidina, "proteínas marcadas con His"). Este método aprovecha la ventaja del hecho de que dos o más residuos histidina pueden cooperar para formar complejos de iones metálicos muy fuertes.

40 Existen numerosas variantes de esta tecnología, donde los residuos histidina se fijan como "marcadores" a la proteína recombinante pertinente en diversas combinaciones, v.g. con inclusión de sitios de reconocimiento para proteasas específicas de tal modo que el marcador his puede eliminarse con posterioridad enzimáticamente.

45 La expresión de proteínas en células de insecto requiere el uso de diversos medios de cultivo especializados e implica también contaminación de la proteína recombinante con diversos constituyentes derivados de células de insecto que no se encuentran en bacterias, hongos y células de mamífero. Esquemas de purificación ideados para proteínas recombinantes producidas en bacterias, hongos, o células de mamífero no son por tanto necesariamente la elección óptima cuando una proteína producida en células de insecto precisa ser purificada.

50 Existe por consiguiente una necesidad continua de mejoras en la purificación de proteínas a fin de obtener proteína de grado farmacéutico derivada de producción recombinante en células de insecto.

Objeto de la invención

55 Es un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para purificar variantes de HER-2 recombinante expresadas en células de insecto. Es un objeto adicional de la invención proporcionar una variante inmunógena de proteína HER-2 que es útil v.g. en el tratamiento del cáncer por medio de inmunoterapia activa específica.

60 **Sumario de la invención**

Los autores de la presente invención han ideado un nuevo método para purificar proteína HER-2 variante hasta un grado de pureza que es aceptable para uso farmacéutico, particularmente para uso como agentes de vacuna.

65 Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para purificación de una variante de la proteína HER-2 humana que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, residuos 17-677, produciéndose dicha variante recombinantemente en un cultivo de células de insecto y siendo una que es adecuada para purificación por medio de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados, comprendiendo el método la obtención,

a partir de dicho cultivo de células de insecto, de una muestra sustancialmente exenta de células que contiene dicha variante, seguida por el enriquecimiento en dicha variante por medio de pasos subsiguientes de

- diafiltración e cambio del medio de cultivo con tampón, seguido por
- cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC), seguido por
- cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), seguido por
- cromatografía de cambio aniónico (AIE).

Otro aspecto de la invención se refiere a una variante inmunógena de la proteína HER-2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, residuos 17-677.

Laroche-Traineau J *et al.*, Journal of Chromatography, Biomedical Applications, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, volumen 737, No. 1-2 enero 2000, páginas 107-117, describen un método para purificación de una proteína bacteriana recombinante, comprendiendo el método diálisis, cromatografía de afinidad de metales, cromatografía de exclusión de tamaños y cromatografía de cambio aniónico.

WO 97/24438 describe composiciones terapéuticas que comprenden células presentadoras de antígeno, que han sido estimuladas *in vitro* con una proteína de fijación de células dendríticas (v.g. GMCSF) y un antígeno polipeptídico. Un antígeno polipeptídico de este tipo es HER-2.

Leyendas de las figuras

Fig. 1: Perfil cromatográfico de la IMAC.

La flecha indica el pico de 104.1

Fig. 2: Perfil cromatográfico de la SEC.

La flecha indica el pico de monómero.

Fig. 3: Perfil cromatográfico de la AIE.

La flecha indica el pico de 104.1.

Fig. 4: Mapa del plásmido vector p992, pMT/hHER2MA5-5DUniHis. hHER2MA5-5D: Gen codificante de la proteína hHER2MA5-5DUH (nucleótidos 3604-5592).

Epítoto P2: Secuencia codificante del epítoto P2 en la proteína hHER2MA5-5DUH (nucleótidos 4357-4401).

Epítoto P30: Secuencia codificante del epítoto P30 en la proteína hHER2MA5-5DUH (nucleótidos 5500-5562).

Sitio de poliadenilación tardío de SV40: Señal poliA (nucleótidos 263-268).

ColE1: Origen de replicación para replicación en *E. coli* (nucleótidos 701-1434).

Gen de resistencia a la ampicilina: gen que confiere resistencia a la ampicilina en bacterias (nucleótidos 1579-2439).

Promotor metalotioneína: Promotor que puede ser inducido con cierto número de compuestos (v.g. cadmio (nucleótidos 3050-3415)). Secuencia semejante a Kozak: Sitio de fijación de ribosoma (nucleótidos 3493-3501)).

Secuencia señal BiP: Secuencia señal que dirige la proteína variante HER-2 a secreción en el compartimento extracelular (nucleótidos 3502-3555).

Secuencia UniHis: secuencia que codifica el marcador UniHis utilizada para purificación de la proteína AutoVac de HER-2 (nucleótidos 3556-3597).

Secuencia de parada de dipeptidasa: Utilizada si el marcador UniHis debe escindirse de la proteína AutoVac HER-2 (nucleótidos 3598-3603).

Descripción detallada de la invención

En lo que sigue se definirán cierto número de términos y expresiones en el contexto de la presente invención.

5 “Una proteína derivada de la familia EGFR” designa una proteína que es homóloga o idéntica a EGFR humana (o ErbB-1); HER-2 humana/neu (ErbB-2); HER-3 (ErbB-3); o HER-4 (ErbB-4).

10 Una proteína “autóloga” de la familia EGFR debe entenderse en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que designa un polipéptido de la familia EGFR de un animal que va a ser vacunado contra su propia proteína de la familia EGFR. Dicho de otro modo, el término es pertinente únicamente cuando se considera la relación con el animal que va a ser vacunado.

15 Los términos “linfocito T” y “célula T” se utilizarán de modo intercambiable para linfocitos de origen tímico que son responsables de diversas respuestas inmunitarias mediadas por células así como de funciones efectoras tales como actividad adyuvante en la respuesta inmunitaria humoral. Análogamente, los términos “linfocito B” y “célula B” se utilizarán de modo intercambiable para linfocitos productores de anticuerpos.

20 Una “célula presentadora de antígeno” (APC) es una célula que presenta epítopes a las células T. Las células típicas presentadoras de antígeno son macrófagos, células dendríticas y otras células fagocíticas y pinocíticas. Debe indicarse que las células B funcionan también como APCs por presentar epítopes T_H fijados por moléculas del MCH clase II a las células T_H, pero cuando se utiliza generalmente el término APC en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones debe entenderse que se hace referencia a las células fagocíticas y pinocíticas arriba mencionadas.

25 “Linfocitos T adyuvantes” o “células T_H” denota células T CD4 positivas, que proporcionan ayuda a las células B y las células T citotóxicas por la vía del reconocimiento de epítopes T_H fijados a las moléculas del MHC clase II en las células presentadoras de antígeno.

30 El término “linfocito T citotóxico” (CTL) se utilizará para células T CD8 positivas, que requieren la asistencia de células T_H a fin de poder activarse.

En el presente contexto debe entenderse que una respuesta inmunitaria “específica” denota una respuesta inmunitaria policlonal dirigida predominantemente contra una molécula o un grupo de moléculas cuasi-idénticas o, alternativamente, contra células que presentan epítopes CTL de la molécula o del grupo de moléculas cuasi-idénticas.

35 En el presente contexto debe entenderse el término “polipéptido” que significa tanto péptidos cortos de 2 a 10 residuos aminoácidos, como oligopéptidos de 11 a 100 residuos de aminoácidos, y polipéptidos de más de 100 residuos de aminoácidos. Adicionalmente, debe entenderse que el término incluye también proteínas, es decir biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando están comprendidos al menos dos polipéptidos, estos pueden formar complejos, estar enlazados covalentemente, o pueden estar enlazados de modo no covalente. El o los polipéptidos en una proteína puede(n) estar glicosilados y/o lipidados y/o comprender grupos prostéticos.

40 El término “subsecuencia” significa cualquier tramo consecutivo de al menos 3 aminoácidos o, cuando es pertinente, de al menos 3 nucleótidos, derivados directamente de una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico existente naturalmente, respectivamente.

45 Por el término “regulación decreciente de una proteína de familia EGFR autóloga” debe entenderse en esta memoria una reducción en el organismo vivo de la cantidad y/o actividad de la proteína de la familia EGFR relevante. La regulación decreciente puede obtenerse por medio de varios mecanismos que incluyen eliminación del CEA por células de barrido (tales como los macrófagos y otras células fagocíticas) y, lo que es aún más importante, que las células que llevan o albergan el antígeno son destruidas por los CTLs en el animal.

50 El término “inmunógeno” debe entenderse que denota una sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria en cierto animal. Por esta razón, debe entenderse que una proteína de familia EGFR autóloga no es un inmunógeno en el hospedador autólogo - es necesario utilizar o bien un adyuvante fuerte y/o co-presentar epítopes adyuvantes T con la proteína autóloga a fin de montar una respuesta inmunitaria contra la proteína autóloga y en tal caso el inmunógeno es la composición de materia que es capaz de romper la autotolerancia.

55 El término “cantidad inmunógenamente eficaz” tiene su significado usual en la técnica, es decir, una cantidad de un inmunógeno, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria, que combate significativamente los agentes patógenos, que comparten características inmunológicas con el inmunógeno.

60 El término “farmacéuticamente aceptable” tiene su significado usual en la técnica, es decir se utiliza para una sustancia que puede ser aceptada como parte de un medicamento para uso humano cuando se trata la enfermedad en cuestión, y por tanto el término excluye de modo eficaz el uso de sustancias altamente tóxicas que podrían empeorar más en lugar de mejorar la condición del o de los individuos tratados.

65 Un “epítipo de células T extraño”, es un péptido que es capaz de fijarse a una molécula del MHC y que estimula las células T en una especie animal. Epítipes extraños preferidos son epítipes “promiscuos”, es decir epítipes que se

fijan a una fracción sustancial de moléculas del MHC clase II en una especie de población animal. Un término, que se utiliza a menudo de modo intercambiable en la técnica, es el término “epítopos universales de las células T” para esta clase de epítopos. Se conoce sólo un número muy limitado de tales epítopos promiscuo de las células T, y los mismos se expondrán en detalle más adelante. Debe indicarse que a fin de que los inmunógenos que se utilizan de acuerdo con la presente invención sean eficaces en una fracción tan grande de una población animal como sea posible, puede ser necesario 1) insertar varios epítopos extraños de células T en el mismo análogo o 2) preparar varios análogos en donde cada análogo tiene un epítopo promiscuo diferente insertado. Debe indicarse que el concepto de epítopos extraños de células T abarca también el uso de epítopos de células T crípticos, es decir epítopos que se derivan de una autoproteína y que ejercen únicamente comportamiento inmunógeno cuando se encuentran en forma aislada sin formar parte de la autoproteína en cuestión.

Un “epítopo de linfocitos T adyuvantes extraño” (un epítopo T_H extraño) es un epítopo de células T extraño, que se fija a una molécula del MHC clase II y puede presentarse en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC) fijada a la molécula del NHC clase II. Es importante también añadir que la característica “carácter extraño” tiene por tanto dos aspectos: un epítopo T_H extraño 1) es presentado en el contexto del MHC clase II por el animal en cuestión y 2) el epítopo extraño no se deriva del mismo polipéptido que el antígeno diana para la inmunización - el epítopo es por consiguiente extraño también para el antígeno diana.

Un “epítopo CTL” es un péptido, que es capaz de fijarse a una molécula del MHC clase I.

El término “adyuvante” tiene su significado usual en la técnica de la tecnología de vacunas, es decir es una sustancia o una composición de materia que 1) no es capaz por sí misma de preparar una respuesta inmunitaria específica contra el inmunógeno de la vacuna, pero que 2) sin embargo, es capaz de mejorar la respuesta inmunitaria contra el inmunógeno. O bien, dicho de otro modo, la vacunación con el adyuvante solo no proporciona una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno, de tal modo que la vacunación con el inmunógeno puede dar lugar o no a una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno, pero la vacunación combinada con inmunógeno y adyuvante induce una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno que es más fuerte que la inducida por el inmunógeno exclusivamente.

“Diafiltración” es una técnica que utiliza membranas de ultrafiltración para eliminar sal o disolvente, intercambiar tampones, o fraccionar biomoléculas de diferente tamaño en soluciones macromoleculares. Las macromoléculas retenidas por la membrana de ultrafiltración se concentran mientras que el disolvente y las especies de peso molecular inferior se eliminan. Sin embargo, una simple concentración de la muestra macromolecular no eliminará por completo las especies más pequeñas. Por esta razón, las especies más pequeñas deben ser “lavadas” de la muestra utilizando volúmenes de lavado múltiples (diafiltración). Después del proceso de diafiltración, la muestra puede concentrarse para análisis o purificación ulterior. Esto representa una ventaja comparado con la filtración con gel o la diálisis en la que la muestra puede diluirse durante el proceso de separación, requiriendo un paso de concentración adicional. No existe pérdida o contaminación alguna cuando se utiliza la diafiltración, como podía ocurrir con el proceso en dos pasos.

“Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados” (IMAC) es una técnica cromatográfica en la cual las proteínas se purifican como consecuencia de su afinidad para ciertos iones metálicos divalentes, véase la descripción en “Antecedentes de la Invención”.

“Cromatografía de exclusión de tamaños” (SEC) es una técnica cromatográfica, en la cual las proteínas y otras macromoléculas se fraccionan de acuerdo con su tamaño físico. Las moléculas pequeñas son retenidas en los poros de la matriz y se eluyen por tanto lentamente, mientras que las moléculas mayores se excluyen y por consiguiente se eluyen prontamente de la matriz.

“Cromatografía de Intercambio de Aniones” (AIE) es una técnica cromatográfica en la cual las moléculas que tienen una carga negativa neta se retienen en la matriz de la columna y se eluyen subsiguientemente por desplazamiento con el anión del tampón de elución o por cambio de la carga neta de la proteína.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a un proceso de purificación que está adaptado especialmente para la purificación de variantes de HER-2 que se han producido por recombinación en células de insecto. La presente invención se ideó en conexión con los esfuerzos que han conducido a la preparación de variantes inmunógenas del antígeno HER-2 asociado al cáncer humano - estas variantes se producen en el sistema de expresión DES[®], un sistema de expresión propiedad de GlaxoSmithKline y comercializado por Invitrogen, entre otros. El sistema utiliza células S2 de *Drosophila* y vectores especializados. El uso de células S2 como células hospedadoras para la producción recombinante ha planteado, sin embargo, su propia serie de problemas a resolver frente a la variante de HER-2 en cuestión, y estos problemas han sido resueltos por utilización del método de inventiva (entre otros, problemas con proteínas comigratorias que se derivan de las células S2).

La proteína particular que se utiliza en los ejemplos es una variante de HER-2 humana, que es inmunógena en humanos - la variante incluye la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2, residuos 17-677. Sin embargo, dado que esta secuencia de aminoácidos no es sí misma adecuada para IMAC, contiene un marcador histidina N-terminal (residuos de aminoácidos 1-14 en SEQ ID NO: 1) que puede ser escindido por una aminodipeptidasa (dipep-

tidil-peptidasa I, DPPI, véase Pedersen J *et al.*, 1999, Protein Expression and Purification 15, 389-400). La secuencia de parada para la diaminopeptidasa está constituida por los residuos 15 y 16 en SEQ ID NO: 2.

Por esta razón, en general el presente método de purificación es especialmente adecuado para aquellas variantes de HER-2 que incluyen una secuencia heteróloga de aminoácidos que facilita la purificación por medio de IMAC. Esta secuencia es una secuencia de aminoácidos heteróloga (es decir no asociada naturalmente con la proteína derivada de la familia EGFR). Las secuencias de aminoácidos preferidas para este propósito son ricas en residuos histidina (v.g. el marcador His₆ y otras secuencias de aminoácidos con varios residuos histidina consecutivos). La secuencia de aminoácidos heteróloga más preferida que facilita la purificación por IMAC es aquella que comprende los residuos 1-14 de SEQ ID NO: 2.

Como se ha mencionado arriba, el proceso de inventiva ha sido ideado en conexión con el trabajo sobre la producción recombinante de ciertas variantes del antígeno HER-2 humano. Estas variantes son características en el sentido de que incluyen epítopes adyuvantes T extraños promiscuos que se introducen en la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de HER-2 humano. Las variantes de HER-2 humano incluyen los epítopes P2 del toxoide del tétanos (residuos 269-282 de SEQ ID NO: 2) y P30 (residuos 649-669 de SEQ ID NO: 2) y la variante más preferida tiene una secuencia de aminoácidos que está constituida por los residuos 1-677 de SEQ ID NO: 2.

20 *Diafiltración/cambio de Tampón*

El paso de diafiltración/cambio de tampón se realiza a una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 25°C. Sin embargo, se utilizan con preferencia temperaturas en la parte inferior del campo, v.g. temperaturas inferiores a 20°C, tales como inferiores a 15°C o inferiores a 10°C. Las temperaturas más preferidas se encuentran en el intervalo comprendido entre 2 y 9°C, por ejemplo en el intervalo entre aproximadamente 3°C y aproximadamente 9°C, con un intervalo de temperatura muy preferido de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 y especialmente preferido de 4 a aproximadamente 6°C. A temperaturas superiores (v.g. más allá de 10°C), existe tendencia a que la proteína se agregue, y esto puede contrarrestarse por adición de un detergente, tal como un detergente del tipo Tween.

Normalmente, la diafiltración se realiza en dos tandas a fin de concentrar inicialmente los compuestos macromoleculares en la muestra del medio de cultivo y después de ello intercambiar el medio de cultivo con tampón. Estos procedimientos se realizan siguiendo protocolos estándar en la técnica, véanse también los ejemplos. Se prefiere que el paso de concentración dé como resultado una concentración comprendida entre 2 y 25 veces la de los compuestos macromoleculares, tal como una concentración entre 2 y 20 veces, 3 y 15 veces, entre 3 y 10 veces. La concentración preferida de compuestos macromoleculares se encuentra en el intervalo comprendido entre 4 y 8 veces, y la concentración más preferida es aproximadamente 5 veces o hasta una concentración total de proteínas del medio que no excede de 3 mg/ml, o con preferencia que no excede de 2 mg/ml.

El cambio de tampón se realiza típicamente en dos pasos subsiguientes, el primero de los cuales tiene lugar a un pH de al menos 6,5 y como máximo 7,2, y el segundo de los cuales tiene lugar a un pH de al menos 7,0 y como máximo 8,0. No obstante, es posible realizar ambos pasos al mismo pH en la parte solapante de los dos intervalos. Típicamente, el cambio de tampón se realiza utilizando un tampón de fosfato.

Una vez completado el cambio de tampón, la severidad de los pasos siguientes se aumenta con preferencia por adición de un agente a la muestra que competirá por la fijación a la matriz cromatográfica en el paso IMAC a fin de reducir la cantidad de fijación no significativa por constituyentes contaminantes. Por ejemplo, la adición de imidazol, histidina o un tampón de alta concentración de sal al diafiltrado y el tampón puede hacerse aumentando la severidad. Con preferencia, cuando se utiliza imidazol, se añade el mismo de tal modo que se alcance una concentración en el intervalo entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 20 mM, con preferencia en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 mM, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM. Se prefiere especialmente una concentración de imidazol comprendida en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 9 mM, tal como una concentración de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 mM, siendo muy preferida una concentración de imidazol de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 mM, tal como una concentración de aproximadamente 5 mM. Cuando se utiliza un tampón con alta concentración de sal (a menudo NaCl), la concentración está comprendida en el intervalo de 100 mM hasta aproximadamente 1 M.

Se prefiere también añadir un detergente a la muestra diafiltrada y que ha sufrido cambio de tampón antes del paso IMAC. El detergente se seleccionará normalmente de un éster de ácido graso de polioxietilen-sorbitán tal como Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, y Tween 85, un alquilaril-poliéter-alcohol tal como Triton X100, un detergente no iónico, y un detergente basado en carbohidrato tal como octilglicosido. El detergente se añade ventajosamente para alcanzar una concentración comprendida entre aproximadamente 0,05% (v/v) y 10% (v/v), tal como aproximadamente 0,1% (v/v).

IMAC

El paso IMAC implica la carga de un medio cromatográfico con un ión metálico divalente antes de la aplicación al mismo de la muestra que ha sufrido cambio de tampón. Típicamente, el ión metálico divalente se selecciona del grupo constituido por Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ y Fe²⁺. Con preferencia, el ión metálico divalente es Zn²⁺.

La elución del medio cromatográfico en la IMAC se realiza por aplicación de imidazol, histidina, un tampón con alta concentración de sal, o un cambio de pH en el medio cromatográfico (típicamente en una columna cromatográfica). Por ejemplo, cuando se utiliza imidazol para elución, esto se realiza ventajosamente por aplicación del imidazol en un solo paso a una concentración comprendida entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 500 mM (tal como entre 100 y 400 mM), con preferencia a una concentración de aproximadamente 200 mM. Alternativamente, cuando se utiliza histidina, esto se hace por aplicación de la histidina en un solo paso a una concentración comprendida entre aproximadamente 20 mM y 400 mM (tal como entre 50 y 200 mM), con preferencia aproximadamente 100 mM. El tampón con alta concentración de sal contiene usualmente NaCl en concentraciones de hasta aproximadamente 1 o incluso 2 M.

SEC

El tamaño medio de poro de la matriz SEC es con preferencia uno que separa las proteínas globulares entre 10 kDa y 600 kDa.

Después de haber aplicado la muestra a la matriz, se realiza la elución con un tampón de fosfato o TRIS o, alternativamente, con un tampón biológico tal como HEPES. El tampón preferido es un tampón TRIS.

El pH se mantiene en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 8 durante la SEC, y con preferencia el pH se mantiene a aproximadamente 7,5.

En caso relevante y necesario (es decir cuando se utiliza un tampón de fosfato en el paso SEC), la muestra que contiene la proteína derivada de la familia EGFR obtenida de la SEC, se diluye antes del paso AIE, a fin de ajustar la concentración de fosfato a un valor inferior a 15 mM, tal como en el intervalo entre 10 y 12,5 mM. Sin embargo, es totalmente sorprendente que la AIE pueda realizarse utilizando dicha concentración de tampón de fosfato.

AIE

El paso final en el procedimiento de purificación de la invención es al menos un paso AIE, uno de los cuales se realiza utilizando una matriz de cambio de aniones fuertes - en realizaciones preferidas, existe también un paso precedente que implica el uso de una matriz de cambio de aniones débiles. Esto implica con preferencia la carga de la muestra que contiene la proteína derivada de la familia EGFR obtenida después de SEC en una matriz de cambio de aniones fuertes o débiles. Típicamente, la elución se realiza con una solución de NaCl tamponada (tampón de fosfato, TRIS o un tampón biológico tal como HEPES) a un pH entre 7 y 8, con preferencia aproximadamente pH 7,5.

La proteína obtenida en el material eluido después de estos pasos tiene una pureza de grado clínico y está sustancialmente exenta de contaminantes derivados del cultivo de células de insecto.

Se contempla que un paso AIE que utilice una matriz de cambio de aniones débiles será aplicable como un paso entre los pasos IMAC y SEC, en lugar de incluir el mismo como parte del paso AIE concluyente.

Pasos opcionales ulteriores

Después de la diafiltración es ventajoso incluir un paso de aclaramiento de virus (v.g. con Tween 20 al 2% y TnBP al 0,3%) y es ventajoso adicionalmente incluir un paso de filtración de virus después de la AIE (v.g. utilizando un filtro Planova 15N o un filtro similar), donde ambos pasos se incluyen a fin de asegurar que el producto resultante esté exento de contaminantes clínicamente inaceptables. En cambio, en el caso de que se emplee un sistema exento de virus, estos dos pasos no son esenciales.

Variante HER-2 de la invención

Como se ha mencionado arriba, el presente método de inventiva se ha concebido cuando se purificaba una variante del antígeno tumoral HER-2 humano. Esta variante particular ha demostrado ser especialmente adecuada como agente de vacunación para inducir reacciones inmunológicas contra HER-2 autólogo, por lo que esta variante particular forma también parte de la presente invención.

En general, el uso específico, la formulación, la producción recombinante, vectores adecuados y células hospedadoras así como otros detalles concernientes a esta variante HER-2 específica pueden encontrarse en la descripción del documento WO 00/20027. Por tanto, en lo que sigue se proporciona solamente una breve exposición que se refiere específicamente a la variante. Así pues, la descripción del documento WO 00/20027 proporciona la doctrina necesaria concerniente a la inmunización con variantes de HER-2 y los métodos generales para producir éstas y su formulación. Asimismo, es relevante la descripción hecha en WO 00/20027 en lo que respecta a la vacunación con ácido nucleico contra el HER-2 autólogo.

Como se ha mencionado arriba, otro aspecto de la presente invención se refiere a una variante inmunógena de la proteína HER-2 que comprende la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2, residuos 17-677. Se prefiere que esta variante sea un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2, residuos 1-677, es decir una variante que incluye también un marcador de purificación rico en histidinilo, constituido por los residuos 1-14 de SEQ ID NO: 2, y una secuencia de parada de aminopeptidasa constituida por los residuos 15 y 16 en SEQ ID NO: 2.

Se incluye también en la presente invención un fragmento de ácido nucleico que codifica esta variante inmunógena de la proteína HER-2, tal como un fragmento de DNA. Un fragmento de DNA especialmente preferido tiene la variante de HER-2 que codifica la secuencia presentada en SEQ ID NO: 1.

Herramientas útiles en la producción recombinante de variantes de HER-2 son vectores que llevan el fragmento de ácido nucleico de la invención. Es especialmente preferido un vector capaz de replicación autónoma. Típicamente, el vector se selecciona del grupo constituido por un plásmido, un fago, un cósmido, un mini-cromosoma, y un virus.

Son especialmente preferidos los vectores de expresión. Un vector de expresión típico de la invención comprende, en la dirección 5' → 3' y en enlace operativo, un promotor para dirigir la expresión del fragmento de ácido nucleico de la invención, opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido conductor que permite la secreción de o la integración en la membrana del fragmento polipeptídico, el fragmento de ácido nucleico de la invención, y opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un terminador.

Para producción recombinante, se prefiere especialmente una célula hospedadora transformada con el vector de la invención. Una célula hospedadora particularmente interesante es una célula de insecto, siendo muy preferida una célula hospedadora derivada de *Drosophila* tal como una célula S2.

Forma también parte de la invención una línea de células estable que lleva el vector de la invención y que expresa el fragmento de ácido nucleico de la invención, y que secreta o lleva opcionalmente en su superficie la variante inmunógena de la proteína HER-2 de la invención.

Adicionalmente, la invención proporciona también una composición inmunógena para inmunización contra la proteína HER-2 en un humano, que comprende la variante inmunógena de la proteína HER-2 arriba descrita en mezcla con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante. Detalles de formulaciones adecuadas pueden encontrarse en WO 00/20027.

Alternativamente, la vacuna puede encontrarse en la forma de una vacuna de ácido nucleico (para detalles concernientes a esta tecnología, véase WO 00/20027). Así, forma parte también de la invención una composición inmunógena para inmunización contra la proteína HER-2 en un humano que comprende el vector arriba descrito en mezcla con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante.

Está abarcado también dentro del alcance de la presente invención un método para inmunizar un humano contra HER-2 autóloga, comprendiendo el método administrar, al ser humano, una cantidad inmunógenamente eficaz de

- la variante inmunógena de la proteína HER-2 descrita en esta memoria o una composición inmunógena que comprende la variante, o
- el vector descrito en esta memoria o una composición inmunógena que comprende dicho vector.

Se prefiere especialmente que este método de inmunización (así como los diferentes medios de inmunización descritos en esta memoria) se utilice para tratamiento o mejora del cáncer.

Preámbulo a los ejemplos

Los ejemplos que siguen utilizan la "molécula 104.1" (véase SEQ ID NO: 2) que es un análogo inmunógeno de la proteína HER-2 asociada al cáncer. No obstante, será comprendido por las personas expertas en la técnica que la doctrina general de la presente invención es aplicable para otras proteínas marcadas con His, especialmente las producidas recombinantemente en sistemas de células de insecto.

El proceso de purificación consta de los 4 pasos de purificación generales siguientes:

1. Diafiltración con cambio de tampón del sobrenadante de la fermentación.
2. Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC)
3. Filtración con gel/Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC)
4. Cromatografía de Intercambio de Anión (AIE).

Existen adicionalmente dos pasos de aclaramiento de virus incluidos en el proceso actualmente preferido, un paso de desactivación de virus y un paso de filtración de virus.

5 *Diafiltración/cambio de tampón*

La diafiltración sirve para tres propósitos: 1) para concentrar la sustancia “104.1”; 2) para eliminar del medio de fermentación sustancias de peso molecular bajo que podrían interferir con el paso de captura subsiguiente, tales como iones metálicos, y 3) para cambiar el tampón por un tampón más adecuado para la cromatografía de quelatos metálicos (IMAC). El cambio de tampón tiene lugar en uno o dos pasos. El primer paso se efectúa en tampón de fosfato 50 mM de pH 7,0; el segundo paso, en tampón de fosfato 50 mM de pH 7,5, es opcional. Si la diafiltración se realiza a pH 7,5, esta secuencia de pH parece ser crítica dado que el paso directo a pH 7,5 conduce a la precipitación de componentes no identificados del medio de fermentación de células de insecto. La concentración se efectúa principalmente para reducir el tipo de carga en la IMAC subsiguiente y reducir el consumo de tampón en el paso de cambio de tampón, y no se ha encontrado esencial para el proceso, dado que la IMAC subsiguiente es por naturaleza un paso de proceso concentrador. La escala de concentración es en la actualidad aproximadamente 5 veces o hasta una concentración total de proteínas del medio que no exceda de 3 mg/ml (con preferencia que no exceda de 2 mg/ml), pero experimentos que utilizan una concentración 10 veces mayor parecen funcionar también cuando el nivel de proteínas no llega a ser tan alto y se espera que sea posible ir más allá, tal como 20 o incluso 25 veces. La concentración ulterior hasta más de las 5 veces descritas en el protocolo puede mejorar el proceso, dado que podría reducir el tiempo de carga en la columna IMAC subsiguiente.

Preparación de la muestra para IMAC

El diafiltrado puede prepararse antes de la aplicación a la columna IMAC por adición de imidazol a una concentración final de 0-10 mM, cuando se utiliza imidazol en el tampón eluyente; si no se añade cantidad alguna de imidazol (o una sustancia similar), se ha experimentado la co-purificación de otras proteínas de las células de insecto con 104.1.

Por el contrario, cuando la elución se realiza con L-histidina, se añade en su lugar sal al tampón de elución. Adicionalmente, se añade Tween 20 (después de la filtración) a una concentración final de 0,1% (v/v). Puede aplicarse hasta 5% para el paso IMAC, y una concentración mayor que 0,1% conducirá a menos formación de dímero. Se espera también que sean útiles otros detergentes, obviamente otros detergentes Tween (Tween 40, 60, 80 y 85).

IMAC

La sustancia 104.1 tiene un denominado marcador His en el término N que tiene afinidad para iones metálicos divalentes complejados en la matriz de la columna. Los parámetros críticos son la elección de ión metálico divalente y la elección del agente/método de elución. Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} pueden utilizarse todos ellos como el ión metálico formador de quelatos. Sin embargo, Zn^{2+} ha proporcionado una recuperación satisfactoria y menos impurezas. Para la elución de la 104.1 capturada pueden utilizarse varias estrategias: 1) Aplicación de imidazol a la columna, 2) aplicación de histidina a la columna, 3) aplicación de tampón con concentración elevada de sal a la columna, y 4) cambio del pH de la columna.

El proceso actualmente preferido utiliza elución por aplicación de L-histidina 100 mM en un solo paso. No obstante, puede utilizarse disminución hasta 50 mM, pero el resultado es 104.1 menos concentrada y menor recuperación. Asimismo, es posible utilizar imidazol (aplicado como una solución 200 mM), y éste puede utilizarse también a concentraciones menores (hasta 50 mM) con el mismo efecto sobre la recuperación.

SEC

El ejemplo que sigue describe que la SEC se realiza en tampón TRIS. No obstante, el fosfato parece funcionar también satisfactoriamente, si bien TRIS es más adecuado para la AIE subsiguiente que el fosfato. Cuando se utiliza fosfato o un tampón TRIS que contiene sal, la dilución del material eluido SEC es necesaria antes de aplicación a la columna AIE a fin de reducir la concentración de fosfato, y esto no será necesario con un tampón TRIS solo.

Si la IMAC se ha efectuado en una concentración de Tween-20 mayor que 0,4% la misma debe ajustarse a < 0,4% en la SEC, dado que la proteína 104.1 no se fija a la columna AIE si la concentración de Tween-20 es mayor que 0,2%. Esto puede diferir cuando la AIE se lleva a cabo en otros sistemas tampón.

Preparación de la muestra para la cromatografía AIE

Las fracciones relevantes de SEC se diluyen en agua, 1 volumen de material eluido + 3 volúmenes de agua, a fin de reducir la concentración de fosfato cuando se pasan en fosfato, dado que éste interfiere con la cromatografía AIE. Este problema se discute también en el párrafo SEC.

Cromatografía AIE

Los parámetros críticos son el pH y la fuerza iónica de la muestra y los sistemas tampón.

- 5 Si la SEC se ha efectuado en TRIS, la preparación de la muestra (dilución en agua) puede evitarse y el volumen de carga (y el tiempo de carga) se reducirán. Cuando la AIE se efectúa en tampón TRIS que incluye sal, la AIE se diluye en tampón TRIS hasta que se alcanza una fuerza iónica inferior a 3 mS/cm.

- 10 El producto global final se analiza por SDS-PAGE, transferencia Western (WB), ELISA, HPLC, inspección visual, DO₂₈₀, pH, Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) y análisis de aminoácidos. Los productos intermedios se analizan por SDS-PAGE, WB ELISA y DO₂₈₀.

- 15 Como será evidente, la AIE se realiza con preferencia como dos pasos consecutivos, donde un primer paso utiliza una matriz de cambio de aniones débiles y un segundo paso utiliza una matriz de cambio de aniones fuertes. Se contempla, no obstante, que el paso que utiliza una matriz AIE débil puede desplazarse, a fin de ser intercalado entre los pasos IMAC y SEC.

Ejemplo 1

- 20 *Cultivo de la variante 104-1 de HER-2*

Producción de la línea de células

- 25 Un cultivo policlonal de células S2 de *Drosophila melanogaster* se transfectó con un vector pMT (sistema DES®, Invitrogen) que contenía el gen codificante de la variante 104.1 de HER-2; la secuencia de ácido nucleico entera de este vector pMT se expone en SEQ ID NO: 1. Las células se transfectaron en paralelo con un plásmido que llevaba un gen que confería resistencia a la higromicina permitiendo el uso de higromicina para la selección de células transfectadas.

- 30 Se utilizó una técnica de dilución limitada para aislamiento de clones celulares simples y se produjo un Banco de Células Maestras (MCB) a partir de la línea de células seleccionada.

Producción de la Proteína AutoVac HER-2

- 35 Se resucita un vial del MCB en un matraz T y se propaga en matraces de sacudidas que contienen medio ExCell 420 (JRH) a 25°C para obtener biomasa suficiente para la inoculación de un biorreactor. Se diluye un total de 45×10^9 células en 3000 ml con ExCell 420 suplementado con glutamina 4 mM, Pluronic F68 al 0,1%, y 0,5 ml/l de antiespumante PD30. Los 3000 ml se utilizan para inocular un biorreactor Applikon (volumen de trabajo 7 l) donde el cultivo se deja crecer durante 3 días a 25°C, dO₂ = 50% (100% = saturación de aire), pH = $6,5 \pm 0,1$ (ajustado con H₃PO₄ al 5% y NaOH 0,5 M), y se agita a 170 rpm.

- 40 Este cultivo se diluye con ExCell 420 suplementado con glutamina 4 mM, Pluronic F68 al 0,1%, y 0,5 ml/l de antiespumante PD30 hasta una concentración total de células de 15×10^6 células/ml, y se utiliza para inoculación de un biorreactor Applikon de 15 l de volumen de trabajo que se mantiene a 25°C, dO₂ = 50% (borboteo con oxígeno puro), pH = $6,5 \pm 0,1$ (ajustado con H₃PO₄ al 5% y NaOH 0,5 M), y se agita a 142 rpm. El cultivo se diluye continuamente con ExCell 420 suplementado con glutamina 4 mM y Pluronic F68 al 0,1% hasta que se alcanza un volumen total de 10 l. La tasa de dilución se ajusta diariamente para prevenir que el número de células descienda por debajo de 15×10^6 células/ml. Se añade manualmente el antiespumante PD30 al cultivo a fin de mantener una concentración total de 50 0,5 ml/l.

- Una vez completada la carga, se inicia la perfusión a 1 RV/día (volúmenes de reactor por día) utilizando el dispositivo acústico de retención de células BioSep (AppliSens) para prevenir la pérdida de células con el medio eliminado. A una concentración de células de 30×10^6 células/l, se introduce el cultivo por adición de un total de CdCl₂ 2 μM (stock 10 mM) al cultivo y al depósito de medio.

- 55 Se recoge el medio de fermentación, se centrifuga para obtener un sobrenadante exento de células, y se filtra a través de un filtro PALL de 0,8/0,22 μm. El sobrenadante estéril resultante se guarda a -80°C hasta su utilización (el almacenamiento hasta 3 meses a -80°C no ha producido problema alguno detectable de estabilidad) o se guarda a 4°C sin (sic) hasta una semana (asimismo sin degradación detectable alguna de la proteína).

El cultivo se da por terminado 10 días después de la inducción y el medio de cultivo residual en el reactor se desecha.

65

Ejemplo 2

Diafiltración/Concentración y Cambio de Tampón

5 Antes de su utilización, si el sobrenadante de la fermentación del Ejemplo 1 se ha mantenido a -80°C, se descongela lentamente a 4°C durante una noche (las últimas 3 a 4 horas pueden realizarse en agua fría), y se guarda después de ello durante un máximo de 3 días a 4°C. En caso contrario, se utiliza directamente el sobrenadante de la fermentación.

10 El sobrenadante de la fermentación se centrifuga en una centrífuga Sorvall RE5C Plus en tubos SCA3000 a 10.000 rpm durante 15 min, a 4°C.

15 La diafiltración se efectúa en una sala fría a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ en un ProFlux M12 (Millipore) con un filtro de Casete Pellicon 2 30 K de $0,5\text{ m}^2$ (Millipore, Cat # P2B030A05). El filtro se guarda antes de su utilización en NaOH 0,1 M. Antes de la diafiltración, el filtro se lava por tanto concienzuda y completamente con agua Milli-Q. El depósito estándar se llena con agua Milli-Q (3 l) y se lava con agua a través del filtro hasta que quedan en el depósito 200 ml. Este procedimiento se repite 3 veces hasta que se ha pasado un total de 12 litros a través del filtro. A continuación, puede iniciarse la diafiltración:

20 Un máximo de 15 l de sobrenadante de fermentación se concentra aproximadamente 5 veces o hasta una concentración total de proteínas del medio que no excede de 2 mg/ml, como se mide por un método calorimétrico.

25 Se pone en marcha la bomba de recirculación. La válvula de contrapresión debe estar parcialmente cerrada, a fin de proporcionar una presión de salida que exhiba contrapresión (v.g. 0,2 bar). La velocidad de la bomba se ajusta a 30-50%. La diferencia de presión debería mostrar 0,7-1,2 bar, dado que éste es valor cuando se utiliza la capacidad máxima del filtro y el flujo a través del filtro corresponde a 3-4 l/min (v.g. P de salida = 0,2 bar, P de entrada = 1,0 bar, $\Delta P = 0,8$). La presión de entrada debe exhibir un valor máximo de 1,4 bar, considerando la vida de los tubos y la eficiencia. Si se desea una presión de entrada mayor, la presión de la bomba de recirculación puede elevarse (%) o podría aumentarse la presión mecánica en los tubos por aplicación de una presión mayor en éstos (escala 0-5). Cuando la válvula de contrapresión se cierra, se recibe una presión mayor de entrada y de salida. La válvula de contrapresión
30 no debería estar nunca totalmente cerrada.

35 Subsiguientemente, el sobrenadante concentrado de la fermentación se somete a cambio de tampón en uno o dos pasos, utilizando primeramente 10 volúmenes de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7,0, y a continuación, en el segundo paso opcional, con 10 volúmenes $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7,5: El depósito estándar en el aparato Millipore ProFlux M12 se llena con tampón hasta un volumen total de 3 l, llenándose asimismo con tampón el depósito lateral. El ajuste del aparato es el mismo que en el caso de concentración de la muestra.

40 Se mide el volumen de la muestra que ha sufrido cambio de tampón (Vb), y se toma una muestra para SDS-PAGE (Sb). La muestra concentrada que ha sufrido cambio de tampón se divide en lotes de 11 ml y 50 ml y se congela rápidamente a -80°C.

Análisis del Diafiltrado

45 Se miden el pH y la fuerza iónica para asegurar la eficiencia del cambio de tampón.

50 La concentración total de proteína se estima espectrofotométricamente a 280 nm en una cubeta de 1 cm. Se utiliza como referencia una muestra diluida 10 veces (diluida en tampón de fosfato de sodio 50 mM de pH 7,5) con tampón de fosfato de sodio 50 mM de pH 7,5 (utilizando la aproximación Abs_{280} de $1 = 1\text{ mg/ml}$ de proteína total). La concentración total de proteína puede medirse adicionalmente por un método calorimétrico de Bradford (BioRad). La concentración específica de la variante 104.1 se mide por ELISA y el diafiltrado se analiza ulteriormente por SDS-PAGE, tinción con plata y detección por WP-ECL.

Observaciones Acerca del Paso de Diafiltración

55 Es importante iniciar el cambio de tampón a pH inferior a 7,1 antes de cambiar a pH 7,5. En caso contrario, los componentes residuales del medio de fermentación precipitan.

60 Se han guardado a -80°C durante varios meses muestras diafiltradas sin cambio de eficiencia en el ELISA cuantitativo de HER-2. No obstante, cuando se descongelan, incluso una breve exposición a 37°C y 54°C hace descender espectacularmente la eficiencia del diafiltrado en el mismo ELISA. Cuando se mantiene a 0°C (hielo/agua) y 4°C después de descongelación desde -80°C, la eficiencia en el ELISA del diafiltrado se mantiene estable durante 4 horas como mínimo.

65 Después de la diafiltración, es conveniente desactivar cualquier virus que pudiera estar presente en el diafiltrado. Para hacer esto, las muestras se descongelan a 2-8°C y se reúnen, se filtran subsiguientemente a través de filtros de 1,0/0,45/0,2 μm , después de lo cual se añaden Tween-20 al 50% y TnBP a una concentración final de 2% y 0,3%, respectivamente. La solución se mantiene a 2-8°C durante 16-20 horas mientras se agita suavemente. La solución se filtra luego hasta 0,2 μm antes del paso subsiguiente de cromatografía IMAC (Ejemplo 3).

ES 2 325 584 T3

Ejemplo 3

IMAC

5 Un principio cromatográfico general para la IMAC es la afinidad entre un “marcador” en la proteína y un complejo quelato con ión metálico en la matriz de la columna. La matriz cromatográfica es POROS 20MC o, con preferencia, 50MC (ambas de Applied Biosystems) y el ión metálico formador del quelato es Zn^{2+} . La molécula 104.1 se provee de un marcador His y el sistema tampón para la fijación de His a la columna matriz es $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, 0,1% Tween 20, pH 7,5.

10 Se cargan 2-4 mg de 104.1 por ml de material de la columna y se eluyen subsiguientemente utilizando L-histidina 100 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7,5, y 0,1% Tween 20. Alternativamente, cuando se eluye con imidazol 200 mM, el sistema tampón para la fijación contiene también imidazol 5 mM.

15 Instrumento: VISION Work Station (Applied Biosystems).

Software: Software de análisis de datos para Vision, BioCAD 700E, software de la serie Version 3, Perseptive Biosystems.

20 Detección: absorbancia UV para $\lambda = 280$ y 220 nm.

Conductividad: 0-200 mS

25 pH calibrado a: 7,0 y 10

Temperatura: El procedimiento se realizó con tampones y columna a la temperatura ambiente (20-24°C) con carga de la muestra en hielo y recogida de las fracciones a 10°C.

30 Preparación de las Muestras

Se añade imidazol 800 mM al diafiltrado que contiene la molécula 104.1 a una concentración final de imidazol 5 mM cuando se utiliza un tampón que contiene imidazol para la elución en la IMAC, añadiéndose en cambio Tween-20 a una concentración final de 0,1% (v/v) cuando se utiliza L-histidina para la dilución en la IMAC. Inmediatamente antes de la aplicación a la columna, la muestra se filtra a vacío a través de un filtro de 0,22 μm . Se mantiene la muestra a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (con preferencia 4°C) hasta la aplicación a la columna, manteniéndola en hielo mientras se aplica. El tiempo de manipulación a la temperatura ambiente debería minimizarse.

40 Columna

POROS 20 MC o 50 MC (preferida) en una columna PEEK de 16 x 100 mm (20,1 ml) (Applied Biosystems) empaquetada a 2000-2500 psi (140-175 kg/cm^2) - dependiendo de la escala del procedimiento de purificación, son igualmente útiles otras columnas.

45

Programa de Carga de la Columna (Carga de Limpieza)

Flujo: 10 ml/min.

50

1. 5 CV de NaPO_4 50 mM (abreviatura para $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7,5, 0,1% Tween-20 (limpio).

2. 5 CV H_2O (Milli-Q).

55

3. 40 CV ZnCl_2 100 mM; pH 4,5.

4. 40 CV H_2O (Milli-Q).

5. 20 CV NaPO_4 50 mM, pH 7,5, 0,1% Tween-20.

60

La columna debería cargarse antes de cada operación.

65 Programa de Cromatografía

Caudal 30 ml/min, carga 5 ml/min.

ES 2 325 584 T3

Tamaño de recogida de fracciones 9 ml, y 5 ml en el pico de elución con L-histidina 100 mM (o, en caso aplicable, en el pico de elución con imidazol 200 mM). Recogida en un colector de fracciones refrigerado (10°C).

La solución que contiene el diafiltrado, desactivado de virus se carga en la columna a 4°C y se lava con 20 CV de NaPO₄ 50 mM de pH 7,5, 0,1% Tween 20, NaCl 0,5 M seguido por 5 CV de NaPO₄ 50 mM de pH 7,5, 0,1% Tween 20 antes de la elución con NaPO₄ 50 mM de pH 7,5, 0,1% Tween 20, histidina 100 mM.

Se agrupan las fracciones procedentes del pico eluido del cromatograma (véase Fig. 1). Se comienza agrupando en el comienzo del pico y se recoge un total de 50 ml (o 1,5 volúmenes de columna) o se agrupan las fracciones basadas en los resultados de SDS-PAGE/WB o ELISA hasta un total de 50 ml. Este conjunto puede recogerse durante una noche a 5 ± 3°C o llevarse inmediatamente a la SEC. Se ha demostrado que el almacenamiento del conjunto hasta 7 días a 5 ± 3°C, -20°C y a temperatura inferior a -70°C no da lugar a pérdida alguna en proteína total después de filtración a través de un filtro de 0,22 µm cuando se analiza en SDS-PAGE y WB-ECL.

15 *Esterilización de la Columna*

Se lava la columna con 5 CV de NaOH 1 M, NaCl 2 M, seguido por 10 CV de agua. Si se necesita esterilización adicional, véase el RSP del fabricante. La columna se guarda en EtOH al 30% a 5-30°C.

20 *Análisis del Compuesto Intermedio IMAC*

El material de partida, el paso directo y las fracciones eluidas se analizan por WB-ECL y SDS-PAGE/con tinción con plata.

Análisis del Conjunto IMAC

30 El conjunto se analiza por WB-ECL y SDS-PAGE/con tinción con plata, HPLC y DO₂₈₀ nm (sobre una muestra diluida 10 veces). La concentración específica de 104.1 se determina por ELISA.

Ejemplo 4

35 *Cromatografía SEC de filtración con gel*

El paso de filtración con gel se efectúa en Tris mM, 0,1% Tween-20, pH 7,5, pero Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM puede sustituir al Tris como sistema tampón. Se cargan 50 ml de la IMAC del Ejemplo 3 por Superloop (Pharmacia) en una matriz Superdex 200 de grado prep.

Instrumento: BioCAD 700E Work Station para Cromatografía de Perfusión equipado con una célula de flujo semi-preparativa para reducir la contrapresión en la columna.

45 Software: Software de análisis de datos para Vision, BioCAD 700E, software de la serie Version 3, Perseptive Biosystems.

Detección: absorbancia UV a $\lambda = 280$ y 220 nm.

50 Conductividad: 0-200 mS.

pH calibrado a: 7,0 y 10

Temperatura: los tampones en la columna se encuentran a la temperatura ambiente (20-24°C) y la muestra se carga directamente desde 4°C. Las fracciones que contienen el monómero 104.1 deberían cambiarse a 4°C inmediatamente después de la recogida si el colector no está refrigerado.

Preparación de la Muestra

60 El conjunto procedente de IMAC en tampón, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, 0,1% Tween 20, L-histidina 100 mM (o imidazol 200 mM), pH 7,5, no requiere preparación especial alguna. La muestra debe mantenerse fría (5 ± 3°C) hasta la carga.

65

ES 2 325 584 T3

Columna

Superdex 200 de grado prep, empaquetada en columna Pharmacia XK 50 x 960 mm (1884 ml) a 15 ml/min como caudal final. Carga máxima 50 ml.

Programa de Cromatografía

Caudal general 8 ml/min, carga 5 ml/min.

Tamaño de las fracciones 9,0 ml.

1. Equilibración, 1,5 CV Tris 20 mM, 0,1% Tween-20, pH 7,5

2. Carga: por vía de Super Loop 50 ml, 5 ml/min

3. Elución 1,2 CV Tris 20 mM, 0,1% Tween-20, pH 7,5.

Las fracciones del pico de monómero (véase Fig. 2) se agrupan por comparación del gel y/o los resultados SE/RP-HPLC a fin de obtener un producto puro (aproximadamente 130 ml). Este conjunto puede recogerse durante una noche a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ o llevarse directamente a la cromatografía AIE del Ejemplo 5. Se ha demostrado que el almacenamiento del conjunto hasta 7 días a $5 \pm 3^\circ\text{C}$, -20°C y temperatura inferior a -70°C no da lugar a pérdida alguna de proteína total después de filtración a través de un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ cuando se analiza por SDS-PAGE y WB-ECL.

Esterilización y limpieza de la columna

La columna se limpia pasando NaOH 0,5 (sic) en la dirección de flujo invertido durante 1-2 h a 6,5 ml/min (20 cm/h) seguido por 3 volúmenes de lecho de tampón. Para la esterilización se hace pasar 0,5-1,0 NaOH en dirección de flujo invertido, 13 ml/min (40 cm/h) durante 30-60 min seguidos por 3-5 volúmenes de lecho de tampón estéril. La columna se guarda en etanol al 20% a $4-8^\circ\text{C}$. Para información adicional se remite al manual de los fabricantes.

Análisis del Compuesto Intermedio de SEC

El material de partida y las fracciones eluidas se analizan por WB-ECL, SDS-PAGE/tinción con plata y SE/RP-HPLC.

Análisis del Conjunto SEC

El conjunto se analiza por WB-ECL y SDS-PAGE/tinción con plata, HPLC y $\text{DO}_{280}\ \text{nm}$. La concentración específica de 104.1 se determina por ELISA.

Observaciones para SEC

Debe garantizarse que la muestra se mantiene a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ entre IMAC y la carga de la Superloop.

Si el colector de fracciones no está refrigerado (10°C), debe garantizarse que las fracciones se cambian a una sala fría/frigorífico inmediatamente después de la recogida.

Cuando la columna se utiliza frecuentemente, se aplica a la columna un flujo constante (0,2 ml/min) de Tris 20 mM, pH 7,5, 0,1% Tween-20 (alternativamente $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM) en lugar de Tris 20 mM y, si es éste el caso, se utiliza Tween-20 al 0,5%).

Ejemplo 5

Cromatografía AIE

Primer paso opcional

La Cromatografía de Intercambio Aniónico se realiza opcionalmente en primer lugar en una matriz Poros 50PI. La columna se equilibra con Tris-HCl 20 mM, 0,1% Tween-20 a pH 7,5. Después de la equilibración, se retiene una muestra para testado de la carga biológica.

ES 2 325 584 T3

El material eluido en la SEC se carga en la columna a 4°C y la columna se lava con 20 CV de Tris.HCl 20 mM, 0,1% Tween-20 a pH 7,5, seguido por elución del producto con Tris.HCl 20 mM, NaCl 250 mM, 0,1% Tween-20, pH 7,5. El producto agrupado se filtra a través de 0,2 µm, se analiza por DO₂₈₀ nm, ELISA de 104.1, RP-HPLC y SE-HPLC, y se guarda a 2-8°C durante 3 días.

La columna Poros 50PI se lava abundantemente con agua (Milli-Q) y se purga con 10 CV de NaCl 2 M, NaOH 1 M antes de guardarla en NaOH 20 mM. La misma se esteriliza con 5 CV de NaOH 0,5 M y se purga con H₂O (Milli-Q) antes de la equilibración y la reutilización subsiguiente.

Paso obligado

La cromatografía de cambio aniónico se realiza a pH 7,5 (TRIS 20 mM), con preferencia sobre una matriz de perfusión de cambio de aniones fuertes POROS 50HQ (Applied Biosystems) en una columna PEEK de 4,6 x 100 mm (1,662 ml). 104.1 se eluye en NaCl 200 mM.

Instrumento: VISION Work Station para Cromatografía de Perfusión. Software: software de análisis de datos para Vision BioCAD 700E, software de la serie Version 3, Perseptive Biosystems.

Detección: absorbancia UV a $\lambda = 280$ y 220 nm.

Conductividad: 0-200 mS.

pH calibrado a: 7,0 y 10

Temperatura: el procedimiento se realizó con tampones y columna a la temperatura ambiente (20-24°C) y carga de la muestra desde hielo. El colector de fracciones estaba enfriado a 10°C.

Preparación de la Muestra

Si se omite el primer paso opcional AI, el compuesto intermedio de SEC puede diluirse en proporción 1 + 3 (al 25%) en agua que contiene 0,1% de Tween-20 bajo agitación magnética moderada. En caso contrario, el material eluido de POROS 50PI se diluye en 15 volúmenes de Tris.HCl 20 mM, 0,1% Tween-20 a pH 7,5 para reducir la conductividad. La muestra debería mantenerse fría ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) hasta y durante la carga.

Columna

Se empaqueta POROS 50HQ en una columna PEEK de 4,6 x 100 mm (1,662 ml) (Applied Biosystems) a 2000-2500 psi (140-175 kg/cm²).

Programa de Cromatografía

Caudal general 10 ml/min, muestra de carga (sic) 5 ml/min.

Tamaño de fracción: 9 ml durante la carga de la muestra, 1 ml durante el primer paso de elución, y 5 ml durante el segundo paso de elución.

La Cromatografía de Intercambio Aniónico se realiza en una columna matriz Poros 50HQ a 4°C. La columna se equilibra con Tris.HCl 20 mM, 0,1% Tween-20 a pH 7,5. Después de la equilibración, se retiene una muestra para test de la carga biológica.

La muestra se carga en la columna y la columna se lava con 10 CV de Tris.HCl 20 mM, 0,1% Tween-20 a pH 7,5 y 10 CV de Tris.HCl 20 mM, NaCl 20 mM, 0,1% Tween-20 a pH 7,5 seguido por elución del producto con Tris.HCl 20 mM, NaCl 200 mM, 0,1% Tween-20 a pH 7,5.

Las fracciones del pico de elución (véase Fig. 3) se agrupan por comparación de los resultados en gel a fin de obtener una concentración mayor que 2,5 mg/ml o DO₂₈₀ nm mayor que 2,5. Las fracciones pueden guardarse durante una noche a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ antes de agruparse. El almacenamiento del conjunto hasta 7 días a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ -20°C y temperatura inferior a -70°C ha demostrado la ausencia de pérdidas en proteína total después de filtración a través de un filtro de 0,22 µm cuando se analizó por SDS-PAGE y WB-ECL.

ES 2 325 584 T3

Esterilización de la Columna

5 Se lava la columna con 10 volúmenes de columna (CV) de NaOH 1 M, NaCl 2 M, seguido por 20 CV de agua. Si es necesaria esterilización adicional, se remite al manual del fabricante. La columna se guarda en etanol al 30% a 5-30°C.

Análisis

10 El material de partida, el flujo directo y las fracciones eluidas se analizan por WB-ECL y SDS-PAGE/con tinción de plata.

Análisis del conjunto AIE

15 El conjunto se analiza por WB-ECL y SDS-PAGE/con tinción con plata, aspecto y descripción, pH, HPLC, LAL y DO₂₈₀ nm (se utiliza una muestra diluida 3 veces). La concentración específica de 104.1 se determina por ELISA.

Observaciones a la AIE

20 Si el compuesto intermedio de la SEC se diluye menos de 1 + 3 (25%), se detecta 104.1 en el flujo directo de la AIE debido a interferencia del tampón de fosfato.

25 Se han aplicado hasta 25 mg de 104.1 a la columna AIE sin cantidades detectables de 104.1 en el flujo directo.

Filtración opcional de virus

30 La filtración de virus y la dilución y el llenado subsiguientes de la sustancia fármaco tienen lugar en un ambiente de Clase 100. Los volúmenes purificados antes de la filtración de una o más operaciones en Poros 50HQ se retiran del almacenamiento congelado y se descongelan a 2-8°C. Los mismos se filtran luego a través de 0,1 µm y se pasan por una membrana de filtración de virus Planova 20N. El filtro se retiene para comprobación de la integridad. El material filtrado de virus se ajusta a una concentración de 2,5-3,0 mg/ml por medida de DO₂₈₀ nm.

35

Almacenamiento del Producto a Granel Final

40 El producto a granel final se guarda a temperaturas inferiores a -70°C en un recipiente de polipropileno o vial CZ después de filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

El producto así obtenido tiene una pureza que es adecuada para uso clínico.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificación de una variante de HER-2 humana que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, residuos 17-677, produciéndose dicha variante recombinantemente en un cultivo de células de insecto y siendo una que es adecuada para purificación por medio de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados, comprendiendo el método la obtención, a partir de dicho cultivo de células de insecto, de una muestra sustancialmente exenta de células que contiene dicha variante, seguida por el enriquecimiento en dicha variante por medio de pasos subsiguientes de
 - diafiltración e cambio del medio de cultivo con tampón, seguido por
 - cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC), seguido por
 - cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), seguido por
 - cromatografía de cambio aniónico (AIE).
2. El método de la reivindicación 1, en donde la variante incluye una secuencia de aminoácidos heteróloga que facilita la purificación por medio de IMAC.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la secuencia de aminoácidos heteróloga es rica en residuos histidina.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende residuos 1-14 de SEQ ID NO: 2.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de HER-2 humana está constituida por los residuos 1-677 de SEQ ID NO: 2.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paso de diafiltración/cambio de tampón se realiza a una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 25°C, con preferencia a una temperatura de aproximadamente 3 a aproximadamente 8°C, opcionalmente con la adición de un detergente tal como Tween cuando la temperatura está más allá de 10°C.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la diafiltración se realiza en dos tandas a fin de concentrar inicialmente los compuestos macromoleculares en la muestra del medio de cultivo y después de ello intercambiar el medio de cultivo con tampón.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los compuestos macromoleculares se concentran entre aproximadamente 2 y aproximadamente 25 veces.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los compuestos macromoleculares se concentran aproximadamente 3-5 veces.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en donde el cambio de tampón se realiza en uno o dos pasos subsiguientes de los cuales el primero tiene lugar a un pH de al menos 6,5 y como máximo 7,2 y el segundo paso opcional de los cuales tiene lugar a un pH de al menos 7,0 y como máximo 8,0.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde se utiliza un tampón de fosfato para el cambio de tampón.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se añade imidazol, histidina o un tampón con alta concentración de sal a la muestra diafiltrada y que ha sufrido cambio de tampón o en donde la muestra que ha sufrido cambio de tampón se mantiene sustancialmente inalterada.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde en el caso de adición de imidazol, se añade éste hasta alcanzar una concentración comprendida entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 20 mM.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un detergente seleccionado de un éster de ácido graso de polioxietilén-sorbitán tal como Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-80, Tween-85, un alquilaril-poliéter-alcohol tal como Triton X100, un detergente no iónico, y un detergente basado en carbohidrato tal como octilglucosido, se añade a la muestra diafiltrada y que ha sufrido cambio de tampón hasta alcanzar una concentración comprendida entre aproximadamente 0,05% (v/v) y 10% (v/v), tal como aproximadamente 0,1% (v/v).
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paso IMAC implica la carga de un medio cromatográfico con un ión metálico divalente antes de la aplicación de la muestra que ha sufrido cambio de tampón.

ES 2 325 584 T3

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el ión metálico divalente se selecciona del grupo constituido por Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , con preferencia Zn^{2+} .
17. El método de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, en donde la elución del medio cromatográfico se efectúa por aplicación de imidazol, histidina, un tampón con alta concentración de sal, o un cambio de pH en el medio cromatográfico.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la elución del medio cromatográfico se efectúa por aplicación de imidazol en un solo paso a una concentración comprendida entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 500 mM, con preferencia a una concentración de aproximadamente 200 mM, o en donde la elución se efectúa por aplicación de histidina en un solo paso a una concentración entre aproximadamente 20 mM y 400 mM, con preferencia aproximadamente 100 mM.
19. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paso SEC implica elución con un tampón de fosfato o TRIS o un tampón biológico, tal como HEPES.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el pH se mantiene a aproximadamente 7-8, con preferencia aproximadamente 7,5.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, en donde el tamaño medio de poro de la matriz SEC separa proteínas globulares entre 10 kDa y 600 kDa.
22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las muestras que contienen la variante obtenida de SEC, en caso necesario, se diluyen antes del paso AIE a fin de ajustar una concentración de fosfato a un valor inferior a 15 mM, tal como en el intervalo comprendido entre 10 y 12,5 mM.
23. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paso AIE implica la carga de la muestra que contiene la variante obtenida después de SEC en una matriz de cambio de aniones fuertes o débiles, o de ambas clases.
24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la elución se realiza con una solución tamponada de NaCl a un pH entre 7 y 8.
25. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se intercala un paso de desactivación de virus entre los pasos de diafiltración/cambio de tampón e IMAC.
26. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paso AIE va seguido por un paso de filtración de virus.
27. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se intercala un paso AIE que utiliza una columna de cambio de aniones débiles entre los pasos IMAC y SEC.
28. Una variante inmunógena de la proteína HER-2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, residuos 17-677.
29. La variante inmunógena de la proteína HER-2 de acuerdo con la reivindicación 28, que está constituida por la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2, residuos 1-677.
30. Un fragmento de ácido nucleico que codifica la variante inmunógena de la proteína HER-2 de acuerdo con la reivindicación 28 ó 29.
31. El fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 30, que es un fragmento de DNA.
32. Un vector que lleva el fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31.
33. El vector de acuerdo con la reivindicación 32, que es capaz de replicación autónoma.
34. El vector de acuerdo con la reivindicación 32 ó 33, que se selecciona del grupo constituido por un plásmido, un fago, un cósmido, un mini-cromosoma, y un virus.
35. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 32-34, que es un vector de expresión.
36. El vector de acuerdo con la reivindicación 35, que comprende en la dirección $5' \rightarrow 3'$ y en enlace operativo, un promotor para dirigir la expresión del fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31, opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido conductor que permite la secreción de o la integración en la membrana del fragmento polipeptídico, el fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31, y opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un terminador.

ES 2 325 584 T3

37. Una célula hospedadora transformada que lleva el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 32-36.

38. Una línea de células estable que lleva el vector de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36 y que expresa el fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31, y que secreta o lleva opcionalmente la variante inmunógena de la proteína HER-2 de acuerdo con la reivindicación 28 ó 29 en su superficie.

39. Una composición inmunógena para inmunización contra la proteína HER-2 en un humano, que comprende la variante inmunógena de la proteína HER-2 de acuerdo con la reivindicación 28 ó 29 en mezcla con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante.

40. Una composición inmunógena para inmunización contra la proteína HER-2 en un humano, que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36 en mezcla con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante.

41. Uso de

- la variante inmunógena de la proteína HER-2 de acuerdo con la reivindicación 28 ó 29, o
- la composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 39, o
- el vector de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36, o
- la composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 40, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer.

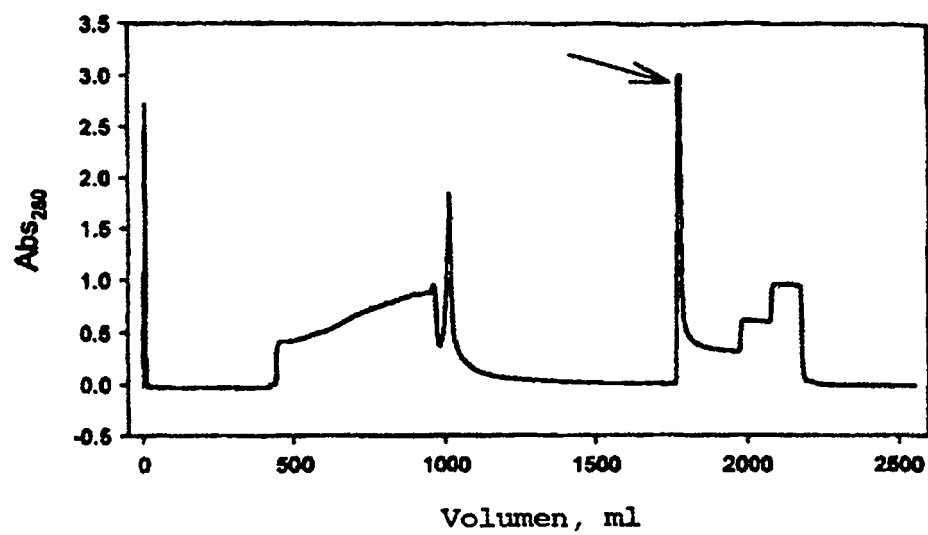


Fig. 1

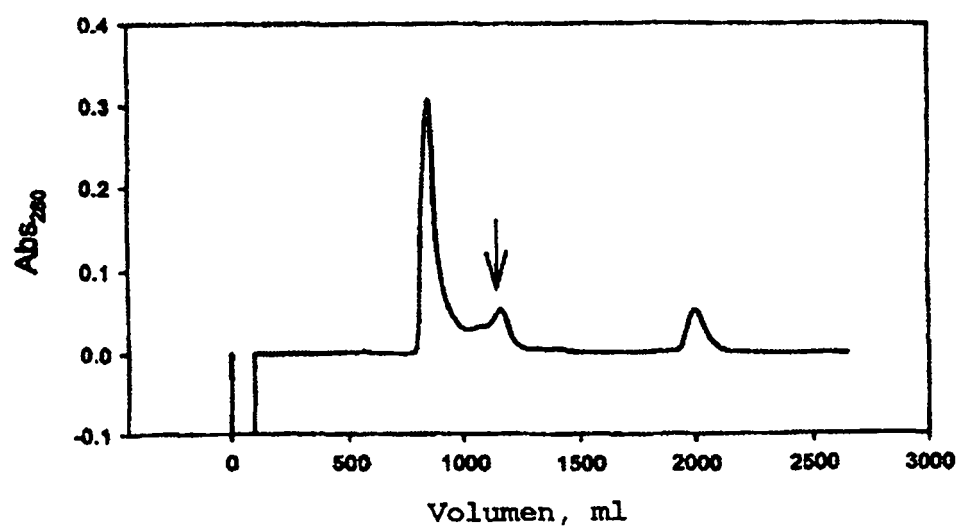


Fig. 2

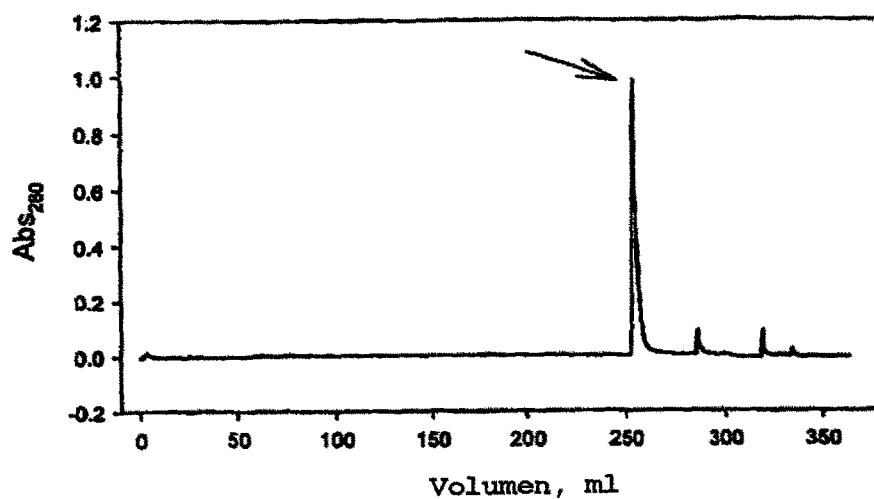


Fig. 3

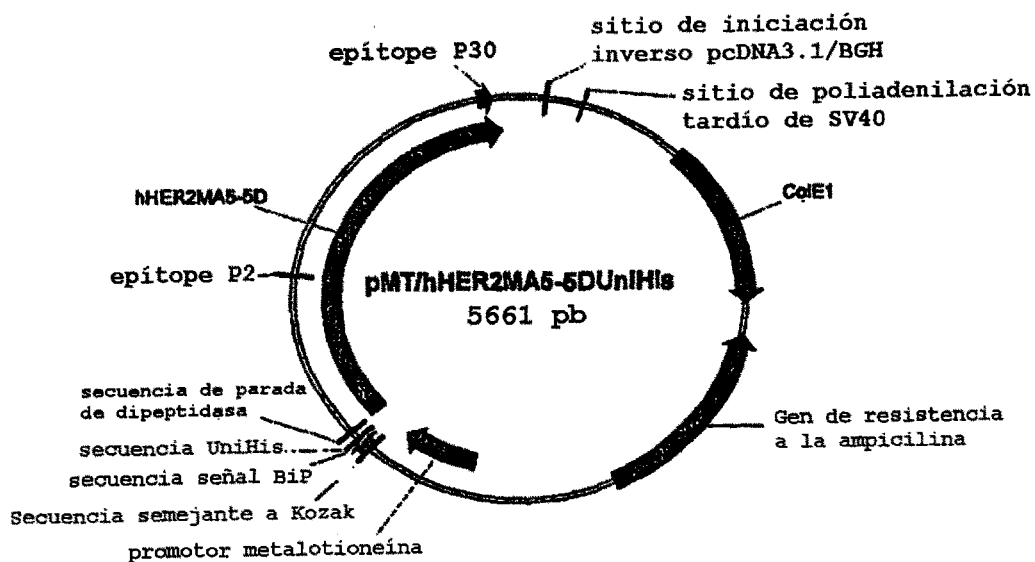


Fig. 4

ES 2 325 584 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <120> PURIFICACIÓN DE VARIANTES DE HER-2
- 5 <130> P1020DK00
- <160> 2
- 10 <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 5661
- 15 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Plásmido de expresión recombinante derivado de pMT
- <220>
- <221> Señal poliA
- 25 <222> (263)..(268)
- <223> Sitio de poliadenilación tardío de SV40
- <220>
- 30 <221> Característica mixta
- <222> (1579)..(2439)
- <223> Gen de resistencia a la ampicilina, codificado por cadena complementaria
- 35 <220>
- <221> Promotor
- <222> (3050)..(3415)
- 40 <223> Promotor metalotioneína
- <220>
- <221> RBS
- 45 <222> (3493)..(3501)
- <223> Secuencia semejante a Kozak
- <220>
- 50 <221> CDS
- <222> (3502)..(5592)
- <223> DNA codificante de variante inmunógena marcada con his de HER-2 humana
- 55 <220>
- <221> Péptido señal
- <222> (3502)..(3555)
- 60 <223> Secuencia señal BiP
- <220>
- <221> Característica mixta
- 65 <222> (3556)..(3597)
- <223> Marcador histidina

ES 2 325 584 T3

<220>

<221> Péptido mat

<222> (3556)..(5589)

5

<220>

<221> Característica mixta

<222> (3598)..(3603)

10

<223> Secuencia de parada de dipeptidasa

<220>

<221> Característica mixta

15

<222> (3604)..(5589)

<223> Gen codificante de la proteína hHER2MA5-5DUH

<220>

20

<221> Característica mixta

<222> (4357)..(4401)

<223> Epítotope P2 del toxoide de la difteria

25

<220>

<221> Característica mixta

<222> (5500)..(5562)

30

<223> Epítotope P30 del toxoide de la difteria

<400> 1

35

ggcgcgctcga gtctagaggg cccttcgaag gtaagcotat ccctaaccct ctectcggtc 60

tcgattctac gcgtaccggg catcatcacc atcaccattg agtttaaacc cgctgatcag 120

cctcgactgt gccttctaag atccagacat gataagatc attgatgagt ttggacaaac 180

40

cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 240

atttgttaacc attataagct gcaantaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat 300

gtttcagggt cagggggagg tgtgggaggt tttttaaagc aagtaasacc tctacaaatg 360

45

tggtatggct gattatgac agtcgacctg caggcatgca agcttggcgt aatcatggtc 420

atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg 480

aagcataaag tgtaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcaat taattgcgtt 540

50

gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg 600

ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga 660

ctcgtcgcgc tcggtcggtc ggctgcggcg agcggatatc gctcactcaa aggcggtaat 720

55

acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca 780

aaaggccagg aaccgtasaa aggcgcggtt gctggcggtt tccatagga tccgcccccc 840

tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggttg cgaaaccga caggactata 900

60

aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 960

gcttacccga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 1020

acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 1080

65

accccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tctcgtcttg agtccaaccc 1140

ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 1200

ES 2 325 584 T3

	gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag	1260
5	gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaanaa gagttggtag	1320
	ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca	1380
	gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	1440
10	cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat	1500
	cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga	1560
	gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtggg gcacctatct cagcgatctg	1620
15	tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga	1680
	gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc	1740
	agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgg cgcagaagtg gtcctgcaac	1800
20	tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	1860
	agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg cagctcgtc	1920
25	gtttgggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	1980
	catgtttgtg aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgtttgtc gaagtaagtt	2040
	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc	2100
30	atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtg gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg	2160
	tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag	2220
	cagaacttta aaagtgtcga tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat	2280
35	cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc	2340
	atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa	2400
	aaagggata agggcgacac ggaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta	2460
40	ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa	2520
	aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga	2580
45	aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgagge cctttcgttc	2640
	gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca	2700
	gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt	2760
50	ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac	2820
	catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat	2880
	tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta	2940
55	cgccagctgg cgaagggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt	3000

ES 2 325 584 T3

	tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgccagtg aattaattcg ttgcaggaca.	3060
5	ggatgtggtg cccgatgtga ctagctcttt gctgcaggcc gtectatect ctggttccga	3120
	taagagaccc agaactccgg cccccaccg cccaccgcca ccccatata tatgtgttac	3180
	gcaagtaaga gtgcctgccc atgccccatg tgccccacca agagttttgc atcccatata	3240
10	agtccccaaa gtggagaacc gaaccaattc ttcgcgggca gaacaaaagc ttctgcacac	3300
	gtctccactc gaatttggag ccggccggcg tgtgcaaaag aggtgaatcg aacgaaagac	3360
	ccgtgtgtaa agccgcgttt ccaaaatgta taaaaccgag agcatctggc caatgtgcac	3420
15	cagttgtggt cagcagcaaa atcaagtga tcatctcagt gcaactaaag gggggatcta	3480
	gatcggggta ccaagtcac c atg aag ttg tgc atc ttg ctg gcc gtc gtg	3531
	Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val	
	-15 -10	
20	gcc ttc gtg ggc ctg tgc ctg ggc atg aag cac caa cac caa cat caa	3579
	Ala Phe Val Gly Leu Ser Leu Gly Met Lys His Gln His Gln His Gln	
	-5 -1 1 5	
25	cat caa cat caa cat caa gcc ccc tcc acc caa gtg tgt acc ggc aca	3627
	His Gln His Gln His Gln Ala Pro Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr	
	10 15 20	
30	gac atg aag ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg	3675
	Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met	
	25 30 35 40	
	ctc cgc cac ctc tac cag ggc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg gaa	3723
	Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu	
	45 50 55	
35	ctc acc tac ctg ccc acc aat gcc agc tta agt ttc ctg cag gat atc	3771
	Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile	
	60 65 70	
40	cag gag gtg cag ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg cag	3819
	Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln	
	75 80 85	
	gtc cca ctg cag agg ctg cgg att gtg cga ggc acc cag ctc ttt gag	3867
	Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu	
45	90 95 100	
	gac aac tat gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg aac aat	3915
	Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn	
	105 110 115 120	
50	acc acc cct gtc aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag ctg cag	3963
	Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln	
	125 130 135	
55	ctt cga agc ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag cgg	4011
	Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg	
	140 145 150	

ES 2 325 584 T3

	aac ccc cag ctc tgc tac cag gac acg att ttg tgg aag gac atc ttc	4059
	Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe	
	155 160 165	
5	cac aag aac aac cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct	4107
	His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser	
	170 175 180	
10	cgg gcc tgc cac ccc tgt tct ccg atg tgt aag ggc tcc cgc tgc tgg	4155
	Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp	
	185 190 195 200	
15	gga gag agt tct gag gat tgt cag agc ctg acg cgc act gtc tgt gcc	4203
	Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala	
	205 210 215	
	ggg ggc tgt gcc cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat	4251
	Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His	
	220 225 230	
20	gag cag tgt gct gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg	4299
	Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu	
	235 240 245	
25	gcc tgc ctc cac ttc aac cac agt ggc atc tgt gag ctg cac tgc cca	4347
	Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro	
	250 255 260	
30	gcc ctg gtc cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc	4395
	Ala Leu Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr	
	265 270 275 280	
	gag ctg cgg tat aca ttc ggc gcc agc tgt gtg act gcc tgt ccc tac	4443
	Glu Leu Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr	
	285 290 295	
35	aac tac ctt tct acg gac gtg gga tcc tgc acc ctc gtc tgc ccc ctg	4491
	Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu	
	300 305 310	
40	cac aac caa gag gtg aca gca gag gat gga aca cag cgg tgt gag aag	4539
	His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys	
	315 320 325	
	tgc agc aag ccc tgt gcc cga gtg tgc tat ggt ctg ggc atg gag cac	4587
	Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His	
	330 335 340	
45	ttg cga gag gtg agg gca gtt acc agt gcc aat atc cag gag ttt gct	4635
	Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala	
	345 350 355 360	
50	ggc tgc aag aag atc ttt ggg agc ctg gca ttt ctg ccg gag agc ttt	4683
	Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe	
	365 370 375	
55	gat ggg gac cca gcc tcc aac act gcc ccg ctc cag cca gag cag ctc	4731
	Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu	
	380 385 390	

ES 2 325 584 T3

5	caa gtg ttt gag act ctg gaa gag atc aca ggt tac cta tac atc tca Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser 395 400 405	4779
10	gca tgg ccg gac agc ctg cct gac ctc agc gtc ttc cag aac ctg caa Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln 410 415 420	4827
15	gta atc cgg gga cga att ctg cac aat ggc gcc tac tcg ctg acc ctg Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu 425 430 435 440	4875
20	caa ggg ctg ggc atc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca ctg agg gaa ctg Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu 445 450 455	4923
25	ggc agt gga ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac ctc tgc ttc gtg Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val 460 465 470	4971
30	cac acg gtg ccc tgg gac cag ctc ttt cgg aac ccg cac caa gct ctg His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu 475 480 485	5019
35	ctc cac act gcc aac cgg cca gag gac gag tgt gtg ggc gag ggc ctg Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu 490 495 500	5067
40	gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg ggt cca ggg ccc Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro 505 510 515 520	5115
45	acc cag tgt gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc cag gag tgc gtg Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val 525 530 535	5163
50	gag gaa tgc cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag tat gtg aat gcc Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala 540 545 550	5211
55	agg cac tgt ttg ccg tgc cac cct gag tgt cag ccc cag aat ggc tca Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser 555 560 565	5259
60	gtg acc tgt ttt gga ccg gag gct gac cag tgt gtg gcc tgt gcc cac Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His 570 575 580	5307
65	tat aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc ccc agc ggt gtg aaa Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys 585 590 595 600	5355
70	cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag gag ggc Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly 605 610 615	5403
75	gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc tgt gtg gac ctg Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu 620 625 630	5451

ES 2 325 584 T3

```

gat gac aag ggc tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc cct ctg acg tcc      5499
Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser
    635                      640                      645

5   ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg ctg cgc gtg ccc aag gtg agc      5547
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
    650                      655                      660

10  gcc agc cac ctg gag atc gtc tct gcg gtg gtt gcc att ctg          5589
Ala Ser His Leu Glu Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
    665                      670                      675

tagaagcttg gtaccgagct cggatccact agtcacgtgt ggtggaattc tgcagatatc      5649

15  cagcacagtg gc                                                    5661

<210> 2
<211> 696
20  <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

<220>
25  <223> Plásmido de expresión recombinante derivado de pSI

<400> 2

30  Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
    -15                      -10                      -5

35  Leu Gly Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln
    -1  1                      5                      10

40  Ala Pro Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu
    15                      20                      25                      30

Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln
    35                      40                      45

45  Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
    50                      55                      60

50  Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr
    65                      70                      75

55  Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu
    80                      85                      90

60  Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala
    95                      100                      105                      110

65

```

ES 2 325 584 T3

	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	
					115					120					125		
5	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	
				130					135					140			
10	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	
			145					150					155				
15	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	
		160					165					170					
20	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	
	175					180					185					190	
25	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	
				195						200					205		
30	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	
				210					215					220			
35	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	
			225					230					235				
40	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu	His	Phe	Asn	
		240					245					250					
45	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val	Gln	Tyr	Ile	
	255					260					265					270	
50	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Tyr	Thr	Phe	
				275					280						285		
55	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	
			290						295					300			
60	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln	Glu	Val	Thr	
			305					310					315				
65	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys	Pro	Cys	Ala	
		320					325					330					
70	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	Arg	Ala	
	335					340					345					350	

ES 2 325 584 T3

Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
 355 360 365
 5
 Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser
 370 375 380
 10
 Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu
 385 390 395
 15
 Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu
 400 405 410
 20
 Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile
 415 420 425 430
 25
 Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser
 435 440 445
 30
 Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu
 450 455 460
 35
 Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp
 465 470 475
 40
 Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg
 480 485 490
 45
 Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys
 495 500 505 510
 50
 Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys
 515 520 525
 55
 Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu
 530 535 540
 60
 Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys
 545 550 555
 65
 His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro
 560 565 570
 Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe
 575 580 585 590

ES 2 325 584 T3

Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met
595 600 605

5

Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro
610 615 620

10

Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro
625 630 635

15

Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Phe Asn Asn Phe Thr Val
640 645 650

20

Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Ile
655 660 665 670

Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
675

25

30

35

40

45

50

55

60

65