Octrooiraad

(12) A **Terinzagelegging** (11) **8402392**

Nederland (19) **NL**

(54) **Deoxyribonucleinezuur; microorganismen; diagnostisch middel voor sigma infectie en gebruik daarvan.**

(51) Int.Cl⁴.: C12N 15/00, C07G 17/00, C07H 21/04, G01N 33/58, A61K 49/02.

(71) Aanvrager: Nederlandse Centrale Organisatie voor Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek te 's-Gravenhage.

(74) Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8402392.

(22) Ingediend 31 juli 1984.

(32) - -

(33) - -

(31) - -

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 17 februari 1986.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

VO 6364

Titel: Deoxyribonucleinezuur; microorganismen; diagnostisch middel voor δ infectie en gebruik daarvan

---

Het delta (δ) agens is een overdraagbaar pathogeen voor mensen, dat individuen met type B virale hepatitis in hetzij de acute fase, hetzij de chronische dragertoestand superinfecteert. Sedert zijn ontdekking door Rizetto et al, Gut 18,997-1003 (1977) is nog geen zekerheid over zijn identiteit verkregen.

De hypothese dat het δ agens een variant van het hepatitis B virus (HBV) is, lijkt verworpen te moeten worden op basis van uitgebreide overdrachtsonderzoeken bij de chimpansee van geselecteerde inocula, welke nog wel overdraagbaar HBV bevatten maar geen δ infectie geven. De hypothese, dat het δ agens een van HBV verschillend nondefectief infectieus virus is moet worden verworpen op grond van de vaststelling dat voor δ infectie de aanwezigheid van oppervlakte-antigeen van HBV (HBsAg) vereist is. Epidemiologische gegevens bij de mens en overdrachtsonderzoeken bij de chimpansee hebben de helperfunctie van HBV in δ infectie aangetoond. Met behulp van immunofluorescentie heeft men het δ -antigeen/anti systeem kunnen opsporen en identificeren, waarbij werd vastgesteld dat er geen immunologische relatie met de bekende antigeen/antilichaam (Ag/Ab) systemen van HBV (respectievelijk oppervlakte(s), kern(c) en envelop(e) antigeen) bestaat. Bij experimentele δ infectie in de chimpansee bleek de aanwezigheid van δ-Ag echter steeds samen te gaan met een discrete subpopulatie van HBsAg deeltjes. Deze deeltjes hebben een grootte van 35 à 37 mm en zijn samengesteld uit het δ-Ag en een daarmee verbonden RNA met laag molecuulgewicht in een kapsel van HBsAg. Hoewel de deeltjes op zichzelf niet uniek zijn voor δ infectie, kon de aanwezigheid van het met het δ-Ag verbonden kleine RNA alleen worden aangetroffen in serum uit de acute fase van de infectie, zowel bij de mens als bij de chimpansee. De hoeveelheid RNA bleek evenredig aan de relatieve δ-Ag concentratie in het serum te zijn, terwijl een specifieke immunoprecipitatie met anti-HBsAg mogelijk bleek.

De veronderstelde helperfuncties van HBV bij δ infectie (d.w.z. replicatie en inkapseling) en de gering grootte van het RNA hebben geleid tot de hypothese, dat het δ agens een uniek defectief agens is, dat voor zijn vermenigvuldiging een of meer helperfuncties (voor replicatie en expressie) van HBV nodig heeft, en dat het δ -RNA met zijn subvirale grootte alleen de genetische informatie voor het δ antigeen codeert. De bij superinfectie van met HBV-geïnfecteerde chimpansees met het δ agens waargenomen onderdrukking van circulerende HBV-merkers (HBV-DNA) vormt een aanwijzing dat het agens de replicatie van het helper HBV verstoort. De inkapseling van het δ agens met HBsAg kan een andere helper functie van HBV zijn, waardoor het agens ontvankelijke hepatocyten kan benaderen.

Uitgaande van deze hypothese is getracht en gelukt om met behulp van DNA recombinant technologie, toegepast op het met δ -antigeen verbonden RNA, een nieuw diagnostisch middel voor δ antigenemie, d.w.z. de aanwezigheid van δ-antigeen in bijvoorbeeld het bloed, op het RNA/DNA niveau te verschaffen, dat de nadelen vermijdt van de bestaande immunologische analyses voor δ-antigeen, te weten verstoring van de bestaande vaste-fase radioimmunoanalyses door de aanwezigheid van hoge anti-δ titers. Het voorbereidende werk omvatte isolatie van het met het δ-Ag verbonden RNA uit acute fase serum van experimenteel geïnfecteerde chimpansees, moleculaire klonering, en partiële kopie DNA (cDNA) sequentie-analyse. Struktuur-analyse met behulp van elektronenmicroscopie en bepaling van de grootte van het RNA met behulp van agarosegelelectroforese (ongeveer 5×10^5 dalton) leidden tot de conclusie, dat het δ-RNA een lineair enkelstrengig molekuul is, dat bij renaturering een sterke mate van intramoleculaire base-paarvorming vertoont. Door van deze eigenschap gebruik te maken kon een moleculaire klonering van het δ-RNA worden gerealiseerd, waarbij een partiële cDNA kloon werd verkregen die ongeveer éénderde van de lengte van het totale genoom besloeg. Door deze cDNA kloon als "probe" te gebruiken kon de hypothese dat het met δ-Ag verbonden RNA het produkt van een HBV variant is, worden verworpen omdat geen kruishybridisatie plaats vond met Southern en Northern blots die uit het serum van een chimpansee tijdens HBsAg antigenemie afkomstig HBV-DNA bevatten.

Ook kon de hypothese worden verworpen, dat het met δ-Ag verbonden RNA een unieke component van de gastheer is, welke kunstmatig met δ-Ag bekleed en door HBsAg ingekapseld wordt, en wel omdat geen hybridisatie optrad met hetzij chromosomaal DNA hetzij totale lever RNA van dezelfde chimpansee vóór HBsAg antigenemie. Nucleotidensequentie analyse van het verkregen partiële cDNA en hybridisatie-experimenten met δ-RNA en streng-specifieke DNA probes, waarbij alleen de probe met het hypothetische open leesraam voor eiwitbiosynthese tot hybridisatie voerde, leidden tot de uiteindelijke conclusie, dat het δ agens een negatieve streng virus is waarin een aan het δ -RNA complementair RNA de codering van δ -Ag verzorgt.

Aldus is door de uitvinding een δ probe ter beschikking gekomen, die gebruikt kan worden voor de klinische diagnose van δ infectie en vrij is van de eerder vermelde, aan immunologische analyses verbonden nadelen.

De uitvinding verschaft daartoe een deoxyribonucleïnezuur (DNA), omvattende DNA met tenminste 60% homologie ten opzichte van een gedeelte van δ-ribonucleïnezuur (δ-RNA) en het vermogen van selectieve hybridisatie met δ-RNA.

Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm verschaft de uitvinding een dergelijk DNA, omvattende kopie DNA(cDNA) van een gedeelte van δ-RNA, welke cDNA het vermogen van selectieve hybridisatie met δ-RNA bezit.

Meer in het bijzonder verschaft de uitvinding een dergelijk DNA, omvattende DNA met de in fig. 1 getoonde basenvolgorde, een daarmee voor tenminste 60% homoloog DNA, of een gedeelte daarvan met het vermogen van selectieve hybridisatie met δ-RNA.

In een bepaalde uitvoeringsvorm verschaft de uitvinding een dergelijk DNA, dat bovendien vector DNA omvat. Een geschikt voorbeeld daarvan vormt een uit vector DNA en cDNA samengesteld plasmide. De uitvinding omvat micro-organismen, zoals Escherichia coli, die een dergelijk DNA bevatten.

Verder verschaft de uitvinding een diagnostisch middel voor het vaststellen van δ infectie, omvattende een van een detecteerbaar label voorzien DNA volgens de uitvinding. Dergelijke detecteerbare labels zijn op zichzelf bekend. Zeer geschikt is het radiolabel ^{32}P.

Tenslotte omvat de uitvinding ook het gebruik van een diagnostisch middel volgens de uitvinding voor het vaststellen van δ infectie. Hierbij wordt op een op zichzelf bekende wijze gebruik gemaakt van het vermogen van selectieve hybridisatie van de gelabelde probe volgens de uitvinding met δ-RNA.

De uitvinding zal aan de hand van het onderstaande experimentele gedeelte nader worden toegelicht. In figuur 1 wordt de basenvolgorde van een gedeelte van het partiële δ-cDNA getoond; in figuur 2 worden de codons en bijbehorende aminozuren getoond; in figuur 3 worden de immunologische, serologische en biochemische gebeurtenissen in een bepaalde chimpansee na inenting met het δ agens getoond.

Bron voor het met δ antigeen verbonden RNA

Ontvankelijke chimpansees (Pan troglodytes) werden geïnfecteerd met hepatitis B virus en de infecties werden gevolgd m.b.v. serologische merkers voor HBsAg, anti HBsAg, ala ine aminotransferase(ALT), aspertaat aminotransferase (AST), bilirubine, γ-glutamaat transpeptidase (GGTP). Tijdens de acute fase van HBV infectie,zoals vastgesteld door de serologische merkers en HBV-DNA, werden de dieren superinfecteerd door intraveneuze toediening van δ agens, afkomstig van het acute fase serum van een chronische HBsAg-drager chimpansee, met δ antigeen in de lever en de bloedsomloop.

Isolatie van nucleïnezuren

Monsterreeksen van met δ agens geïnfecteerde chimpansees werden geanalyseerd op het met δ antigeen verbonden RNA door van elkeserummonster een laag uit te spreiden op een 4 ml. kussen uit 20% (w/w) sucrose in 0,01 M fosfaat, pH 7,9 / 0,85% NaCl en 5 uur bij 4°C ultracentrifugatie bij 200.000 x g in een Beckman SW 41 rotor, zoals beschreven door Rizetto et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77,6124-6128 (1980). Korrelvormige deeltjes werden voor het nucleïnezuur-gehalte geëxtraheerd door ze opnieuw te suspenderen in 0,2 M NaCl/0,01 M natrium EDTA /2% Na Dod SO_4/0,05M Tris-HCl, pH 8,0/1 mg/ml. proteïnase K (Sigma) en 1-2 uur incubatie op 37°C. Na extractie met gelijke volumehoeveelheden fenol en chloroform, werd de waterfase met ethanol neergeslagen. Nader onderzoek omvatte het gebruik van electronenmicroscopie en gelelectroforese, waarbij nucleïnezuren werden geanalyseerd door 0,6 - 1,5% horizontale agarosegelelectroforese onder zowel native als denaturerende omstandigheden.

Moleculaire klonering van cDNA

De van acute fase serum deeltjes afkomstige, met ethanol neergeslagen nucleïnezuren, werden direct gebruikt voor cDNA synthese, volgens de door Ohno et al in Nucl. Acids Res. 11, 6185-6202 (1983) beschreven procedure, met dit verschil dat de monsters tevoren gedurende vijf minuten in water op 70°C werden verwarmd en in vast kooldioxide-ethanol werden afgekoeld. Vervolgens werd met behulp van AMV reverse transcriptase DNA gesynthetiseerd, dat complementair was aan het met δ antigeen verbonden RNA, op de door Efstratiados et al in Cell 7, 279-288 (1976) beschreven wijze, met deze uitzondering dat de toevoeging van een exogene primer achterwege werd gelaten. Het enkelstrengig cDNA werd gebruikt als primer-template voor de synthese van de tweede streng m.b.v. het Klenow fragment van DNA polymerase. Op de door Dijkema et al in Nucl. Acids Res. 12, 1227-1242 (1984) beschreven wijze volgden digestie met S1 nuclease, grootte-bepaling van dubbelstrengig cDNA, staartvorming van dubbelstrengig cDNA/vector, en transformatie van competente E.coli.

Uitzoeken van recombinante clonen

E.coli transformanten, waarin sequenties van het met δ antigeen verbonden RNA aanwezig waren, werden uitgezocht door in situ kolonie-hybridisatie volgens Grunstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965 (1975), waarbij als probe RNA werd gebruikt, dat afkomstig was uit hetzij acute fase serum deeltjes hetzij controle lever. ^{32}P-RNA fragmenten werden bereid door partiële hydrolyse van het RNA in 25 mM glycine-NaOH, pH 9,0, 5 mM $MgCl_2$ gedurende 3 uur bij 37°C (zie de eerder genoemde publicatie van Ohno et al) en daaropvolgende labeling met γ-^{32}P/ATP en T_4 polynucleotide kinase Na incubatie gedurende 30 minuten bij 37°C werden de gelabelde RNA-fragmenten geëxtraheerd met fenol/chloroform en neergeslagen met ethanol. Hybridisatie in 50% formamide en wassen werden op de door de eerdergenoemde publicatie van Dijkema et al beschreven wijze uitgevoerd.

Southern en Northern blotting

DNA/RNA monsters werden gefractioneerd door electroforese onder niet-denaturerende of denaturerende (formaldehyde) omstandigheden in 0,6 - 1,5% agarosegels. Gefractioneerde monsters werden voor niet-denaturerende en denaturerende gels respectievelijk overgebracht op hetzij Schleicher en Schull (BA 85), hetzij Gene Screen nitrocellulose filters.

De omstandigheden voor hybridisatie en wassen waren conform de voorschriften van de leveranciers.

Op de door Maxam et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977) beschreven wijze werd een DNA sequentie-analyse uitgevoerd.

Resultaten

Overdracht van het δ agens op ontvankelijke chimpansees.

In figuur 3 worden de immunologische, serologische en biochemische gebeurtenissen getoond, die in een van de chimpansees (no. 15) plaatsvonden na inenting met het δ agens. Boven in de figuur wordt de aanwezigheid (+) of afwezigheid (-) van HBV - DNA respectievelijk met δ -antigeen verbonden RNA, zoals geschat door agarosegelelectroforese, aangegeven. Het middelste gedeelte van de figuur toont in grafiekvorm de aanwezigheid van de serologische merkers ALT (zwarte driehoeken), AST (witte driehoeken), bilirubine (witte rondjes) en GGTP (witte vierkantjes). Het onderste gedeelte van de figuur toont in grafiekvorm de titer van het serum HBsAg (zwarte bolletjes) en het anti-HBsAg (witte bolletjes), uitgedrukt als de verhouding van positief tot negatief P/N.

Op het moment van de superinfectie met het δ agens vertoonde het dier antigenemie als gevolg van HBsAg, blijkend uit circulerend HBsAg en HBV-DNA. Superinfectie leidde tot een voorbijgaande antigenemie, welke tot uiting kwam in verhoogde ALT-AST niveaus 3 weken na de inenting. Hoewel gedurende deze periode de hoeveelheid circulerend HBsAg nagenoeg constant bleef, was het gehalte aan HBV-DNA reeds 2 weken na de inenting uitgesproken minder geworden. Met δ antigeen verbonden RNA werd reeds 2 weken na de inenting gedetecteerd en bereikte na 3 weken een optimum, hetgeen samenviel met de ALT-AST merkers. Na 4 weken kon in het serum geen met δ antigeen verbonden RNA meer worden gedetecteerd en 7 weken na de inenting veranderden de sera van het dier in anti-HBsAg.

Moleculaire klonering

Omdat de structuuranalyse (electronenmicroscopie) van het met δ antigeen verbonden RNA een enkelstrengige lineaire aard liet zien, werd eerst de aanwezigheid van een poly(A)staart onderzocht. De aanwezigheid van een poly(A)staart kon echter noch door binding van het RNA aan oligo (dT)-cellulose kolommen noch door "priming" van de cDNA synthese met oligo $(dT)_{12-18}$ worden aangetoond.

Omdat het RNA onder natieve omstandigheden een struktuur vormt met een sterke interne basepaarvorming, werd aangenomen dat het bestaande vrije 3'-uiteinde als primer zou kunnen dienst doen voor de synthese van het eigen cDNA. Het op deze wijze bereide cDNA werd volgens standaardtechnieken gekloneerd en de beschikbare hoeveelheid vergroot door vermenigvuldiging van hybridevectoren in E.coli. Door differentiële hybridisatie met ^{32}P-gelabeled RNA, verkregen uit hetzij het acute faseserum, hetzij een kontrolelever, werden recombinantklonen uitgezocht. Eén transformant reageerde alleen positief met de RNA probe uit het acute faseserum. Deze als p δ-1 aangeduide kloon werd daarna als probe gebruikt voor het uitzoeken van een Northern blot van gefractioneerde RNA-monsters, die in de loop van de acute fase van antigenemie in chimpansee Nr. 15 waren geïsoleerd. Daarbij bleek dat hybridisatie alleen optrad met monsters waarvan eerder was aangetoond dat ze met δ antigeen verbonden RNA bevatten, en de migratiepositie viel samen met de geschatte (enkelstrengige) lengte van 1750 nucleotiden. Er werd geen hybridisatie waargenomen met totale lever RNA, vóór HBsAg antigenemie geëxtraheerd chromosomaal DNA, of totaal serum DNA dat gedurende de HBsAg antigenemie van chimpansee Nr. 15 was geëxtraheerd, in Northern en Southern blots.

Nucleotidesequentie van p δ-1

Doordat gebruik gemaakt was van de techniek van dG/dC-staartvorming, toegepast op met het restrictie-enzym PstI opengeknipt pBR322 en δ-cDNA, kon het ingevoegde fragment weer worden verwijderd door incubatie met PstI. De ingevoegde lengte van p δ-1 werd geschat op 520 baseparen. De nucleotidevolgorde werd gedeeltelijk vastgesteld en is in Fig. 1 afgebeeld. De drie mogelijke leesramen zijn onderzocht op het voorkomen van translatie terminatie codons (TAA, TGA en TAG). Slechts één leesraam toonde een stuk van voldoende lengte voordat een stopcodon (TGA) verscheen, 70 baseparen voor het einde van het cDNA. Het translatieprodukt van een deel van dit hypothetische gen wordt in Fig. 2 getoond.

Streng specificiteit van met δ antigeen verbonden RNA

Teneinde vast te stellen welke streng van p δ-1 equivalent was met het met δ-antigeen verbonden RNA zijn twee streng specifieke DNA probes gemaakt. Hiertoe werd een digestie van p δ-1 uitgevoerd met het restrictie-enzym BglII (dat slechts één knipplaats in het δ-cDNA deel van p δ-1 bezit) en werden de corresponderende uiteinden gelabeled met

behulp van γ-^{32}P ATP en T4 polynucleotide kinase. Daarna volgde digestie van de gelabelde hybridevector met hetzij het restrictie-enzym AvaI hetzij het restrictie-enzym TaqI, en de gelabelde fragmenten werden gescheiden op een 5% polyacrylamidegel, geïsoleerd, en gebruikt voor hybridisatie met uit het acute faseserum van chimpansee Nr. 15 geïsoleerde RNA monsters. Hierbij werd gevonden dat alleen de BglII-AvaI probe een positieve hybridisatie vertoonde met het δ-Ag verbonden RNA, hetgeen aantoonde dat zijn complementaire streng equivalent was met het RNA.

* C O N C L U S I E S *

1. Deoxyribonucleïnezuur (DNA), omvattende DNA met ten minste 60% homologie ten opzichte van een gedeelte van δ-ribonucleïnezuur (δ-RNA) en het vermogen van selectieve hybridisatie met δ-RNA.

2. DNA volgens conclusie 1, omvattende kopie DNA (cDNA) van een gedeelte van δ-RNA, welk cDNA het vermogen van selectieve hybridisatie met δ-RNA bezit.

3. DNA volgens conclusie 1 of 2, omvattende DNA met de in Fig. 1 getoonde basenvolgorde, een daarmee voor ten minste 60% homoloog DNA, of een gedeelte daarvan met het vermogen van selectieve hybridisatie met δ-RNA.

4. DNA volgens een van de conclusies 1-3, dat bovendien vector DNA omvat.

5. Microorganismen, die DNA volgens conclusie 4 bevatten.

6. Diagnostisch middel voor het vaststellen van δ infectie, omvattende een van een detecteerbaar label voorzien DNA volgens een van de conclusies 1-3.

7. Diagnostisch middel volgens conclusie 6, waarin het DNA is voorzien van het radiolabel ^{32}P.

8. Gebruik van een diagnostisch middel volgens conclusie 6 of 7 voor het vaststellen van δ infectie.

8402392
Nederlandse Centrale Organisatie voor
Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek

```
                10          20          30          40          50          60
5'→ CCCCGTTGCT TTCTTTACTT TCCTCCTCGC TTCGGTCTCC CCCTACTCCT AGCATCTCCT
    GGGGCAACGA AAGAAATGAA AGGAGGAGCG AAGCCAGAGG GGGATGAGGA TCGTAGAGGA

                70          80          90          100         110         120
    CCTATCGCTA TGGTCTTACT CCTACCGCTC GAAGCGCCTC TTGTTCGCTG AAGGGGTCCT
    GGATAGCGAT ACCAGAATGA GGATGGCGAG CTTCGCGGAG AACAAGCGAC TTCCCCAGGA

                130         140         150         160         170         180
    CTGGAGGTGA TTTCTCTGCT CATCTCCGAG TGGATTCCTC CCTCTGGGTG CTACTCAACC
    GACCTCCACT AAAGAGACGA GTAGAGGCTC ACCTAAGGAG GGAGACCCAC GATGAGTTGG

                190         200         210         220         230         240
    CTTCGGGCCG GAGTGCTCTC CAGATCTGGA GGTTGGGCCC CTCGGATCGG GAGGCCCGCT
    GAAGCCCGGC CTCACGAGAG GTCTAGACCT CCAACCCGGG GAGCCTAGCC CTCCGGGCGA

                250         260         270         280         290         300
    CCTTTTTCTT CCACCTTCCT CTTTCCCCTT CCAGAGATTC TCCGGCGTTG TGGGGATCTC
    GGAAAAAGAA GGTGGAAGGA GAAAGGGGAA GGTCTCTAAG AGGCCGCAAC ACCCCTATAG

                310         320         330         340         350         360
    GTCCGCTTCC TGAGACCTCT CTTTGCTTCT TGGGAGTAGT TTCTCCGACG TTCCAATGCT
    CAGGCGAAGG ACTCTGGAGA GAAACGAAGA ACCCTCATCA AAGAGGCTGC AAGGTTACGA

                370         380         390
    CTTTACCGTG ACATCCCCTC TCGGGAGCTG A
    GAAATGGCAC TGTAGGGGAG AGCCCTCGAC T ←—5'
```

FIG.1

8402392

Nederlandse Centrale Organisatie voor
Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek

FIG.2

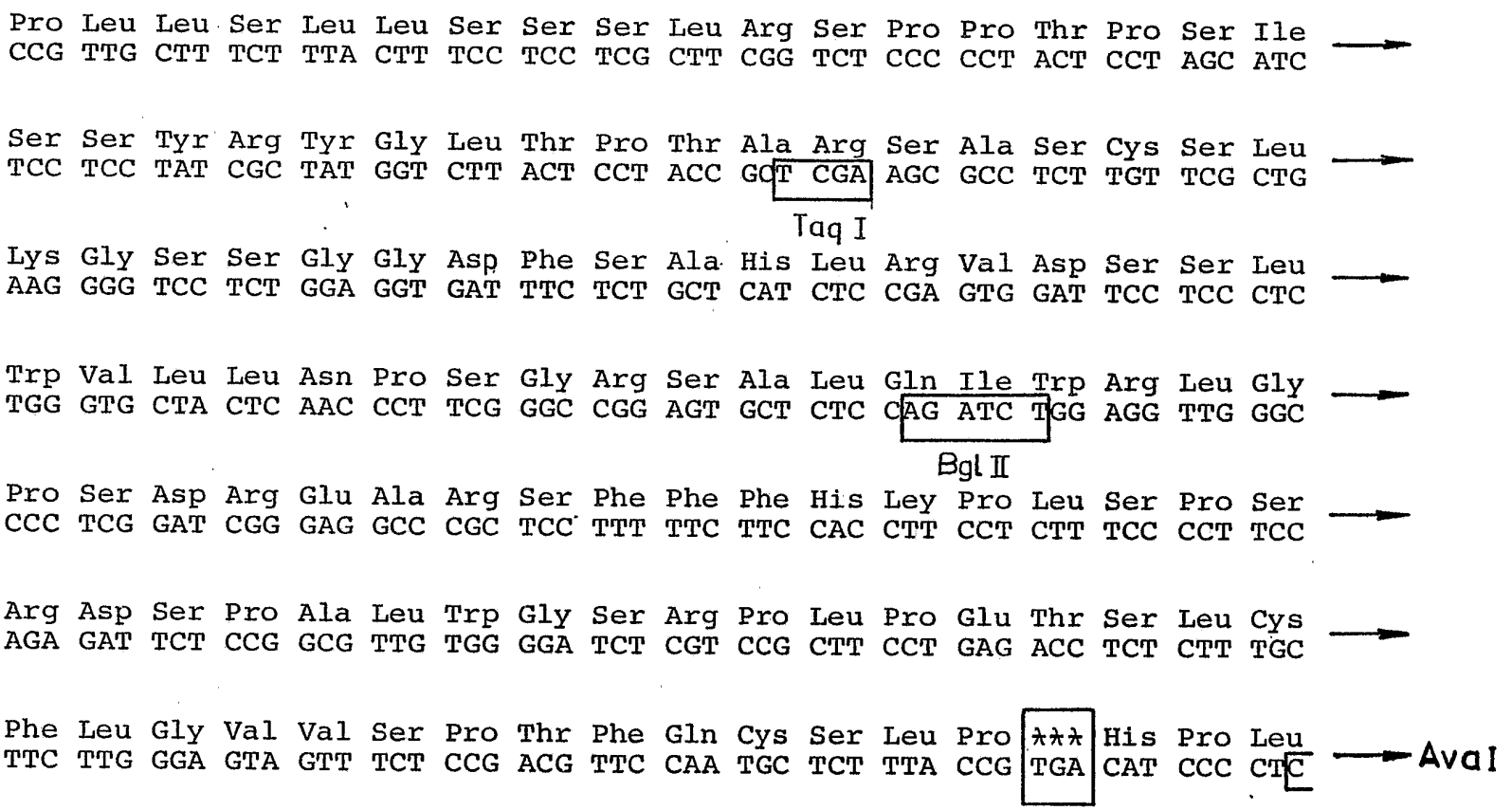
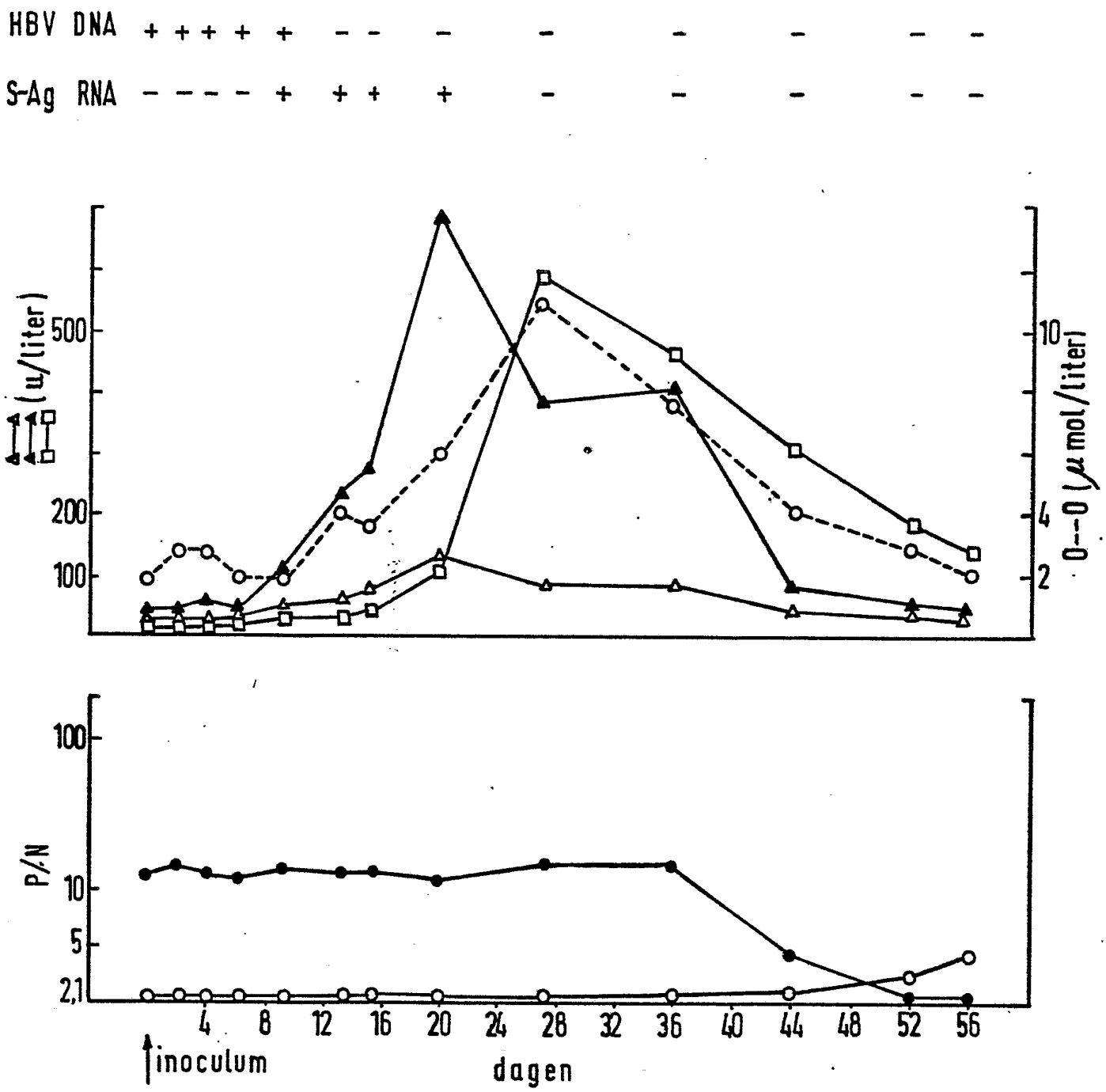


FIG.3



8402392

Nederlandse Centrale Organisatie voor
Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek