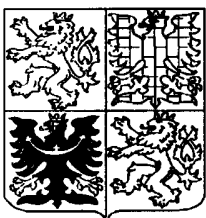


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 27.04.92
(32) 27.04.92, 29.04.91
(31) 92US/9203472, 91/692924
(33) WO, US
(40) 13.04.94

(21) 2271-93

(13) A3

5(51)

C 12 N 15/36

A 61 K 39/29

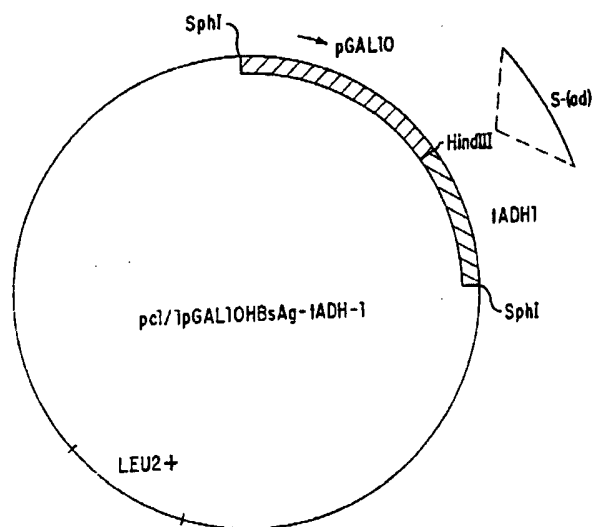
C 07 K 15/00

(71) MERCK CO., Inc., Rahway, New Jersey, US;

(72) Kniskern Peter J., Lansdale, Pennsylvania, US;
Hagopian Arpi, Lansdale, Pennsylvania, US;

(54) **Povrchové proteiny HBV se sníženým obsahem uhlohydrátu z hostitele**

(57) Při výrobě povrchových proteinů viru Hepatitis B (HBV) ve formě částic s podstatně sníženým obsahem strženého uhlohydrátu se DNA kódující povrchové proteiny HBV exprimuje v rekombinantním kvasinkovém hostiteli, který deficientním, pokud se týče jeho schopnosti glykosylovat proteiny. Tyto HBV povrchové proteiny obsahují antigenová místa geneticky kódovaná doménou s otevřeného čtecího rámce obalu virionu HBV a obsahují podstatně snížené množství strženého uhlohydrátu, ve srovnání s částicemi HBsAg produkovanými v kvasinkových buňkách "divokého typu". Získané částice jsou užitečné jako očkovací látka jak při aktivní, tak při pasivní léčbě nebo při prevenci chorob a/nebo infekcí způsobených HBV nebo jinými činiteli, která jsou serologicky příbuzná HBV.



Povrchové proteiny HBV se sníženým obsahem uhlohydrátu z hostitele

Oblast techniky

Vynález se týká povrchových proteinů HBV se sníženým obsahem uhlohydrátu z hostitele a očkovacích látek na jejich bázi.

Dosavadní stav techniky

Virus Hepatitis B (HBV) je infekční čínidlo, které je zodpovědné za několik druhů jaterních chorob člověka. Mnozí pacienti, kteří jsou infikováni HBV jsou postiženi akutní fází choroby, po níž následuje uzdravení. Určité procento infikovaných jednotlivců se však infekce nezbaví a stávají se chronickými nosiči této infekce. HBV infekce je v mnoha částech svět endemická, přičemž v mnoha případech přechází infekce perinatálně z chronicky infikovaných matek na narozené děti, a také u nich často zůstává chronickou. Celkový počet postižených osob ve světě je odhadován na více než 300 milionů. Z tohoto souboru nosičů každý rok několik set tisíc lidí za rok umírá působením dlouhodobých důsledků chronické Hepatitis B (cirrhosa a/nebo hepatocelulární karcinom).

Virus Hepatitis B delta je čínidlo, které je při současné infekci HBV zodpovědné za akutně propukající chorobu, která je obvykle fatální. Delta virus nekóduje (na základě svého původního genetického materiálu) proteiny, které slouží jako obal virionu; tento virus spíše enkapsiduje s obalovými proteiny kódovanými koinfekčním HBV, čímž má blízký strukturní a imunologický vztah k HBV proteinům, které jsou popsány dále. V současné době není známo, zda jiná infekční čínidla mají podobný vztah k HBV.

Je však zřejmé, že proteiny s větší šířkou serologické reaktivity nebo zvýšenou imunogenní potencí by byly užitečné v systémech pro diagnózu nebo prevenci (nebo též léčení) chorob (nebo infekcí) založených na třídě činidel, která mají jen malou nebo částečnou antigenní křížovou reaktivitu vůči HBV.

HB virion se skládá ze dvou skupin strukturních proteinů, jaderných proteinů a obalových či povrchových proteinů. Kromě toho, že jsou obalové proteiny hlavními povrchovými proteiny virionu, t.j. "Dánské částice", jsou též hlavními složkami "Australského antigenu" nebo 22nm částic. Tyto obalové proteiny jsou translačními produkty velkého otevřeného čtecího rámce viru (ORF) kódujícího přinejmenším 389 aminokyselin (aa). ORF je rozdělen do tří domén, z nichž každá začíná kodonem ATG, který je schopen fungovat jako iniciační místo translace in vivo. Tyto domény jsou označeny symboly preS1 (108aa), preS2 (55aa), a S(226aa) v odpovídajícím pořadí 5'-3' v genu. Tyto domény tedy definují 3 polypeptidy označené symboly S nebo HBsAg (226aa), preS2+S (281aa) a preS1+preS2+S (389aa). Tyto polypeptidy bývají také označovány symboly p24/gp27, p30/gp33/gp36 a p39/gp42 (a někdy také jako hlavní, střední a velký protein).

Obalové proteiny HBV jsou glykoproteiny s uhlohydrátovými postranními řetězci (glykany) připojenými N-glykosidickými vazbami k definovaným rozpoznávacím místům peptidu [Heermann a další, J. Virol. 52, 396 (1984) a Stibbe a další J. Virol. 46, 626 (1983)]. HBV polypeptidy produkované v průběhu přirozené infekce tedy obsahují druh p24/gp27 (polypeptid S a jeho glykosylovaný derivát), gp33/gp36 (polypeptid preS2+S glykosylovaný pouze v doméně preS2 a stejný polypeptid glykosylovaný jak v doméně S, tak v doméně preS2) a p39/gp42 (peptid preS1+preS2+S a jeho derivát glykosylovaný v doméně preS1). Vakcíny získané z

plasmy, které jsou v současné době dostupné, jsou složeny z proteinů, které zřejmě obsahují pouze doménu S (zahrnující monomer p24 a jeho glykosylovaný derivát gp27), zatímco až dosud úspěšně vyvinuté vakcíny z kvasinek se skládají výlučně z polypeptidu S, který obsahuje pouze neglykosylovaný druh p24).

22nm částice HBsAg byly purifikovány z plasmy chronických nosičů. Poněvadž plasma těchto nosičů je označována jako pozitivní vzhledem k částicím, také samotní tito chroničtí nosiči jsou označovány HBs⁺. Pokud jsou infikované osoby schopny vyvinout dostatečnou imunitní odpověď, zbaví se infekce a stávají se HBs⁻. Vzhledem k tomu, že si vytvoří protilátky proti HBs, jsou tito jednotlivci označováni jako anti-HBs⁺. Tímto způsobem dochází ke korelaci anti-HBs⁺ s vyléčením choroby, s imunitou vůči reinfekci touto chorobou a s imunitou vůči reinfekci HBV. Od stimulace tvorby anti-HBs pomocí HB vakcín se tedy očekává dodání ochrany proti HBV infekci.

Tuto hypotézu bylo možno prověřit experimentálně. Kromě člověka je jedním z mála živočišných druhů, které jsou plně susceptibilní vůči HBV infekci, šimpanz, jak to reflektují kvantifikovatelné markery, jako je HBs⁺ a zvýšená hladina jaterního enzymu v séru. Šimpanzi byli očkováni třemi dávkami purifikovaných částic HBsAg a potom byli provokováni intravenosním podáním infekčního HBV. Zatímco u zvířat očkových kontrolní vakcínou se dostavily známky akutní HBV infekce, zvířata očkováná HBsAg byla úplně chráněna před projevem infekce. V tomto experimentálním systému tedy částice HBsAg (složené z p24 nebo z p24 a gp27) zcela postačovaly pro indukci ochranné imunity. Pod vlivem těchto pozorování začalo několik výrobců vyrábět HB vakcíny složené z částic HBsAg.

Nedávno vznikl na základě několika nezávislých sérií důkazů předpoklad, že sekvence preS mohou být důležité při udělování imunity vůči HBV. Imunitní eliminace antigenů preS v průběhu virové infekce se zdá být prognostická pro zbavení se viru a eliminaci infekce [Budkowska a další, Ann. Inst. Past./Imunn., 136D:56 až 65, (1985)]. V průběhu akutní infekce Hepatitis B vznikají protilátky proti doméně preS čisto dříve než protilátky proti S [Petit a další, Mol. Immun., 23: 511 až 523, (1986)]. U inbredních myší se zdá být imunitní odpověď vůči S a preS regulována nezávisle a přítomnost domény preS může ovlivnit imunitní odpověď vůči S [Milich a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8168 až 8172, (1985), J. Immunol., 137: 315 až 322 (1986; Neurath a další, J. Med. Virol., 17: 119 až 125, (1985)]. Kromě toho, protilátky vůči doméně preS neutralizují virovou neúčinnost in vitro [Neurath a další, Vaccine, 4: 35 až 37, (1986)] a antigeny preS chrání imunizované šimpanzy proti infekci HBV [Itoh a další, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9174 až 9178, (1986)]. Ve světle těchto pozorování a díky užitečnosti rekombinantních kvasinek (jak je podrobně uvedeno dále), pro výrobu HB vakcin z rekombinantní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly experimentální HB vakciny podle tohoto vynálezu vytvořeny na bázi rekombinantního kmene *S. cerevisiae*.

Za účelem zvýšení dodávek HB vakcin se výrobci obrátili k rekombinantní DNA technologii pro zprostředkování exprese virových obalových proteinů. Z mikrobiálních systémů byly pro expresi mnoha proteinů získávaných rekombinantní technologií nejčastěji používány kmeny *Escherichia coli* a *S. cerevisiae*. Mnoho pokusů exprimovat imunologicky účinné částice HBsAg v *E. coli* bylo neúspěšných. Naproti tomu *S. cerevisiae* se ukázal být velmi vhodným díky své schopnosti exprimovat imunologicky účinné částice HBsAg. Ukázalo se, že když jsou tyto částice (výlučně složené z p24) zpracovány na

vakcínu, jsou schopny úplně ochránit šimpanzy při provokaci živým HBV nebo různých serotypů. Kromě toho částice S získané z kvasinek jsou také imunologicky účinné a stejně účinné jako HBsAg získaný z plasmy při prevenci choroby nebo infekce při klinických zkouškách na lidech [Stevens a další, JAMA, 257: 2612 až 2616 (1987)]. Z toho důvodu je užitečnost *S. cerevisiae* jako hostitelského druhu pro řízení syntézy rekombinantního HBsAg zjištěna nade vší pochybnost. Kromě toho, exprese humáních terapeutických činidel a očkovacích látek v kvasinkách může být velmi užitečná pro vývoj produktu, poněvadž kvasinky neobsahují endotoxiny, nejsou patogenní vůči člověku, je možno je fermentovat v průmyslovém měřítku a při jejich využívání lze upustit od mnoha bezpečnostních opatření, která doprovázejí využití kontinuálních linií savčích buněk (mnohé z nich jsou virově transformovány, mohou být tumorigenické u myší a všechny obsahují protoonkogeny).

S. cerevisiae (pekařské droždí) je eukaryot, který je schopen syntetizovat glykoproteiny. Glykosylace proteinu v kvasince je předmětem mnoha nedávno publikovaných přehledných článků [zejména: Kukuruzinska a další, Ann. Rev. Biochem, (1987), 56, 915 až 944; Tannen a další, BBA, (1987) 906, 81 až 99]. K této glykosylaci či adici glykanů na vhodné receptorové aminokyseliny (aa) v polypeptidu dochází buď na specifických serinových (Ser) nebo threoninových (Thr) zbytcích (vazba přes kyslík), nebo na specifických asparaginových (Asn) zbytcích (vazba přes dusík). Specifičnost vzhledem k vazbě přes kyslík na zbytky Ser nebo Thr není jasně vysvětlena a stanovuje se empiricky případ od případu.

Signální sekvence pro glykosylaci přes dusík je dobře definována, jakožto buď aminokyselinová sekvence Asn-X-Thr nebo Asn-X-Ser (kde X představuje libovolnou aminokyselinu). Kromě toho, že jsou kvasinky schopny

syntetizovat mnohé autologní, nativní, glykosylované proteiny (mj. mannoproteiny nebo mannopeptidy), jsou též schopny glykosylovat heterologní nebo cizí proteiny exprimované rekombinantní technologií (pokud heterologní protein obsahuje vhodnou glykosylační signální sekvenci buď pro N- nebo O-glykosylaci).

Polypeptidy preS2+S, které jsou produkovány v průběhu přirozené infekce, neobsahují více než dva "jaderné" N-vázané glykany (o velikosti přibližně 3 kilodaltony (kD)), jeden v oblasti S a druhý na zbytku na Asn, na aminokyselinovém zbytku 4 domény preS2. Rozpoznávací místo v doméně S není glykosylováno ani v Recombivax HB^(R), ani v rekombinantním preS2+S, syntetizovaném v kvasince. Místo představovatné aminokyselinovým zbytkem 4 domény preS2 je však kvasinkou rozpoznáno a glykosylováno.

Doména preS1 obsahuje N-vázané glykosylační místo na aminokyselinovém zbytku 4 oblasti preS1 a potenciální místo na aminokyselinovém zbytku 26 v případě serotypu adw. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že argumenty uvedené pro preS2 glykosylaci jsou platné též pro různé sekvence v oblasti preS2 a také pro sekvence v doméně preS1 a S.

Kvasinka syntetizující rekombinantní preS1+preS2+S nebo preS2+S přidává jaderný glykan, který se podobá glykanu přidávanému k nativnímu polypeptidu v průběhu virové infekce. Když však je kvasinková hostitelská buňka "divokého typu" vzhledem ke glykosylaci (t.j. když obsahuje úplný komplement enzymů požadovaných pro nativní glykosylaci, což je případ prakticky všech obvykle používaných kmenů kvasinek), značný počet těchto glykanů je prodloužen velkým počtem přídatných mannosových zbytků stejným způsobem, jakého kvasinky používají při tvorbě svých vlastních strukturních mannoproteinů. Tato rozšířená adice glykanu,

pokud probíhá na cizím genovém produktu, jako je polypeptid preS2+S, je označována termínem hyperglykosylace. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že argumenty uvedené pro kvasinky se také vztahují na jiné hostitelské buňky (například hmyzí nebo houbové buňky atd.), které mohou být podrobeny různým typům glykosylačního postupu.

Dále bylo ukázáno, že rekombinantní formy 22nm, částic povrchových proteinů HBV, které jsou exprimovány v kvasinkových hostitelských buňkách divokého typu, mohou strhávat značná množství kvasinkového buněčného uhlohydrátu (který přinejmenším zčásti pochází ze strukturních mannoproteinů a mannopeptidů kvasinkové hostitelské buňky). Tento stržený uhlohydrát by mohl způsobovat potenciální problémy v tom, že by mohl vyvolávat tvorbu protilátek proti kvasinkovým uhlohydrátovým zbytkům glykosylovaných proteinů a imunogen očkovací látky obsahující stržený kvasinkový uhlohydrát by reagoval s anti-kvasinkovými protilátkami přítomnými u většiny druhů savců a tím by potenciálně snižoval svou účinnost jakožto imunogen a očkovací látka.

Hyperglykosylaci a strhávání úplných mannoproteinů a mannopeptidů je možno eliminovat nebo lze glykosylaci omezit v polypeptidech preS a S HBV a jejich odpovídajících částicích, kterýmkoliv z následujících přístupů.

Předně lze hyperglykosylaci přes dusík zabránit nebo jí lze omezit v průběhu růstu rekombinantního hostitele tím, že v růstovém médiu je přítomno exogenní činidlo (například tunikamycin). Za druhé, polypeptidy z rekombinantních nebo přírodních zdrojů je možno deglykosylovat buď chemicky (například bezvodou trifluormethansulfonovou kyselinou nebo bezvodým fluorovodíkem) nebo enzymaticky (například N-glykanasou, Endo-F nebo Endo-H) nebo fyzikálně (například působením ultrazvuku). Za třetí, rozpoznávací

místo pro glykosylaci může být změněno nebo vypuštěno mutagenesí na úrovni DNA, aby se tak zabránilo glykosylaci a tím také hyperglykosylaci. Takové modifikované preS+S otevřené čtecí rámce (ORF), v nichž byla změněna glykosylační rozpoznávací sekvence (za řízení vhodnými promotory aktivními v kvasinkách) byly transformovány do hostitelských kvasinkových buněk. Výsledné polypeptidy preS+S nejsou glykosylovány. Za čtvrté, je možno identifikovat hostitelské buňky, které neobsahují kritické enzymy potřebné pro glykosylaci. Posledně uvedený přístup je ilustrován v tomto vynálezu, aniž by se vynález na něj omezoval. Jeden takový kvasinkový kmen byl identifikován (mnn⁹-mutant) [Ballou L. a další, (1980), J. Biol. Chem., 255, str. 5986 až 5991]. Tento kmen postrádá kritický enzym na glykosylační dráze, kterého je zapotřebí pro prodloužení (hyperglykosylaci) N-vázaných glykanů; chemické studie ukazují, že tento mutant vytváří mannoproteiny bez vnějšího řetězce mannosových zbytků, přičemž obsahuje pouze "jaderný" uhlohydrát [Ballou C. E. a další (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, str. 3081 až 3085; Tsai P. a další (1984), J. Biol. Chem., 259, str. 3805 až 3811]. Pro transformaci takového mutantního kvasinkového kmene mnn⁹ bylo použito otevřeného čtecího rámce (ORF) pro polypeptid S a preS+S (přičemž transkripce je řízena vhodnými promotory aktivními v kvasinkách). Výsledný polypeptid preS+S (obsahující preS1+preS2+S, preS2+S, preS1, preS2 nebo preS1+preS2) obsahuje pouze "jadernou" glykosylaci a nikoliv hyperglykosylaci.

Přestože polypeptidy S nejsou při expresi v kvasinkách ani glykosylovány ani hyperglykosylovány, částice, které se z nich skládají, obsahují podstatnou koncentraci strženého uhlohydrátu, který pochází z kvasinkového mannopeptidu. Exprese polypeptidů, které obsahují polypeptidy S a polypeptidy preS v kvasinkových buňkách,

které nejsou schopny hyperglykosylace, má proto za následek snížení obsahu uhlohydrátu v exprimovaných 22nm částicích.

S. cerevisiae je velmi vhodný kmen, díky schopnosti exprimovat imunologicky aktivní 22nm částice. Tyto částice, po zapracování do očkovací látky, jsou schopny plně ochránit šimpanzy proti provokační infekci živým HBV. Kromě toho, HBsAg získaný z kvasinek se ukázal být imunologicky stejně účinným při klinických zkouškách na lidech jako HBsAg získaný z plasmy. Užitečnost *S. cerevisiae*, jakožto hostitele pro řízení syntézy rekombinantního HBsAg je tedy nade vší pochybnost.

U řady rekombinantních mikrobiálních expresních systémů se ukázalo, že syntéza mnoha různých polypeptidů je škodlivá pro hostitelskou buňku. V důsledku toho existuje selektivní tlak proti expresi takových polypeptidů, takže jedinými buňkami, které se akumulují při přenesení rekombinantní kultury do většího měřítka, jsou ty buňky, které přestaly exprimovat cizí polypeptid nebo ho exprimují tak málo, že se kultura stává neekonomickou, jakožto zdroj tohoto polypeptidu. V některých případech je tento škodlivý účinek tak silný, že když je exprese vyvolána silným konstitutivním promotorem, nově transformované buňky nejsou schopny propagace a nevytvářejí kolonie na selektivních mediích. Tyto škodlivé účinky lze překonat za použití indukovatelného promotoru pro řízení syntézy takových polypeptidů. V *S. cerevisiae* existuje řada indukovatelných genů. Čtyřmi dobře charakterizovanými indukovatelnými genetickými systémy jsou geny pro utilizaci galaktosy (GAL), gen pro alkohol dehydrogenasu 2 (ADH2), gen pro faktor α -párování a gen *pho5*.

S. cerevisiae obsahuje 5 genů, které kódují enzymy zodpovědné za utilizaci galaktosy, jakožto zdroje uhlíku pro

růst. Geny GAL1, GAL2, GAL5, GAL7 a GAL10 kódují (v uvedeném pořadí) galaktokinasu, galaktosa permeasu, hlavní isozym fosfoglukomutasy, α -D-galaktosa-1-fosfát uridyltransferasu a uridin difosfogalaktosa-4-epimerasu. Za nepřítomnosti galaktosy je detegována pouze velmi malá exprese těchto enzymů. Pokud se buňky nechají růst na glukose a potom se ke kultuře přidá galaktosa, jsou tyto tři enzymy indukovány koordinovaně, přinejmenším tisíckrát (s výjimkou GAL5, kde dochází k pětinasobné indukci) na úrovni transkripce RNA. Geny GAL1, GAL2, GAL5, GAL7 a GAL10 byly molekulárně klonovány a sekvenovány. Regulační a promotorová sekvence na 5'straně příslušné kódovací oblasti byla umístěna vedle kódovací oblasti pro gen lacZ. Tyto experimenty definovaly promotorové a regulační sekvence, kterých je zapotřebí a které postačují pro indukci galaktosy.

S. cerevisiae obsahuje také tři geny, z nichž každý kóduje isozym ADH. Jeden z těchto enzymů ADHII je zodpovědný za schopnost *S. cerevisiae* utilizovat ethanol jako zdroj uhlíku v průběhu oxidačního růstu. Expresa genu ADH2, který kóduje isozym ADHII je katabolitově potlačena glukosou, takže v podstatě nedochází k žádné transkripci genu ADH2 v průběhu fermentačního růstu za přítomnosti koncentrace glukosy 1 g/l. Po vyčerpání glukosy a za přítomnosti nerepresivních zdrojů uhlíku je transkripce genu ADH2 indukována stonásobně až tisícinásobně. Tento gen byl molekulárně klonován a sekvenován a byly definovány regulační a promotorové sekvence, kterých je zapotřebí a které postačují pro derepresi transkripce.

Faktor α -párování je sexuální feromon *S. cerevisiae*, kterého je zapotřebí pro párování mezi buňkami MAT α a MATa. Tento tridekapeptid se exprimuje jako prepro-feromon orientovaný do hrubého endoplasmického retikula a potom se glykosyluje a proteolyticky zpracovává na svou

konečnou maturovanou formu, která je sekretována buňkami. Této biochemické dráhy se používá jako strategie pro expresi cizích polypeptidů. Gen faktoru pro α -párování byl molekulárně klonován a jeho promotoru s pre-pro-vedoucí sekvencí bylo využito pro expresi a sekreci různých polypeptidů. Podobně se ukázalo, že promotor genu *pho5* je indukovatelný nízkými koncentracemi fosfátu a toho lze také využít pro fyziologickou regulaci exprese cizích proteinů v kvasinkách.

Jak lze očekávat na základě jejich traverse hrubého endoplasmového retikula a Golgiho aparátu, cizí proteiny jsou schopny glykosylace jak přes atom dusíku tak přes atom kyslíku. Promotor párovacího faktoru α je účinný pouze v těch buňkách, které mají fenotyp α . V *S. cerevisiae* existují čtyři genetická místa, známá jako SIR, která syntetizují proteiny potřebné pro represi jiných normálně tichých kopií a - a α -informace.

Léze, které jsou citlivé vůči teplotě (*ts*) a které interferují s touto represí, existují v genovém produktu přinejmenším jednoho z těchto míst. V tomto mutantu růst při 35 °C ukončuje represi, což vede ke vzniku buněk s fenotypem a/α , v nichž je promotor faktoru α -párování inaktivní. Po úpravě teploty na 23 °C se fenotypicky buňky vrací na typ α , takže promotor se stává aktivním. Použití kmenů s lézí *ts* SIR bylo demonstrováno pro regulovanou expresi několika cizích polypeptidů.

Úkolem tohoto vynálezu je získat povrchový protein HBV, který vytváří částice, s podstatně sníženým obsahem strženého uhlohydrátu. Dalším úkolem vynálezu je vyvinout způsob produkce povrchových proteinů HBV, které vytvářejí částice a které mají podstatně snížený obsah strženého

uhlohydrátu, expresí v kvasinkovém hostiteli. Dalším úkolem vynálezu je vyvinout očkovací látku proti HBV s obsahem částic proteinu HBV, s podstatně sníženým obsahem strženého uhlohydrátu, přičemž tato očkovací látka by byla vhodná pro aktivní a pasivní léčbu nebo prevenci chorob a/nebo infekcí způsobených HBV nebo jinými činidly, která jsou serologicky příbuzná HBV. Ještě dalším úkolem tohoto vynálezu je vyvinout podmínky pro pěstování rekombinantních hostitelských buněk ve velkém měřítku a pro purifikaci rekombinantních povrchových proteinů HBV. Tyto a další úkoly vynálezu jsou zřejmé z dalšího popisu.

Podstata vynálezu

Podle vynálezu byly povrchové proteiny HBV exprimovány ve vysokém výtěžku v rekombinantním kvasinkovém hostiteli, který je geneticky deficientní, pokud se týče jeho schopnosti glykosylovat proteiny. Exprese povrchových proteinů HBV v kvasinkových buňkách má za následek tvorbu charakteristických částic. Tvorba těchto částic v hostitelské kvasinkové buňce má za následek strhávání kvasinkových buněčných látek do těchto částic. Jestliže se použije hostitelských kvasinkových buněk "divokého typu", může být v částicích HBsAg strženo značné množství uhlohydrátu kvasinkových buněk. Aby se obešla tvorba očkovací látky proti HBV s obsahem částic s podstatným množstvím uhlohydrátu, je možno povrchové proteiny HBV vyrábět a purifikovat za použití rekombinantního kvasinkového hostitele, který je geneticky nedostatečný, pokud se týče jeho schopnosti glykosylovat proteiny. Povrchové proteiny HBV, které jsou produkovány v takovém hostiteli, vytváří částice obsahující podstatně méně uhlohydrátu ve srovnání s částicemi produkovánými v kvasinkových buňkách divokého typu. Tyto částice na bázi povrchových proteinů HBV, jsou užitečné jako očkovací látka

pro léčbu a/nebo prevenci infekcí majících vztah k HBV a jako antigen pro imunologickou diagnostiku vykazující sníženou reaktivitu s přírodními anti-kvasinkovými protilátkami.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1. je schematicky znázorněn diagram plasmidu pCl/lpGAL10HBsAg-tADH-1, který obsahuje promotor pGAL10 vyvolávající transkripci otevřeného čtecího rámce HBsAg, po němž následuje terminátor tADH1 a selekční marker Leu2+.

Jak již bylo uvedeno výše, vynález je zaměřen na způsob výroby částic povrchového proteinu HBV, které obsahují podstatně snížené množství strženého uhlohydrátu a které se hodí pro použití jako očkovací látka proti HBV.

Jako zdroje nukleové kyseliny HBV pro izolaci virových otevřených čtecích rámců bylo použito "Dánských" částic (serotypu adw). Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že vynález se vztahuje na použití nukleové kyseliny z kmenů HBV nebo příbuzných virů s jinými serologickými reaktivitami, které vyplývají z genetické rozdílnosti virů. Pro tvorbu kovalentně uzavřené kruhové dvouřetězcové DNA genomu HBV z nukleové kyseliny obsahující zlomy a mezery, která se nativně vyskytuje ve virionu HB, bylo použito endogenní reakce s polymerasou. DNA byla izolována, úplně rozštěpena EcoRI a klonována do místa EcoRI v pBR322, za vzniku pHBV/ADW-1. Selekcí byly získány rekombinantní plasmidy obsahující genom HBV v kruhově permutované formě v místě EcoRI oblasti preS. Byl zkonstruován úplný otevřený čtecí rámeček kódující 55 aminokyselin z oblasti preS2 a 226 aminokyselin z oblasti S postupem, který zahrnoval nejprve purifikaci fragmentu o délce 0,8 tisíc bázových párů (kbp)

získaného po štěpení pHBV/ADW-1 pomocí EcoRI a AccI. Tento fragment kóduje polypeptid preS2+S, pouze bez iniciačního kodonu, aminoterminálních tří aminokyselin, karboxy-terminálních tří aminokyselin a translačního terminátorového kodonu.

Byly syntetizovány oligonukleotidy a potom ligovány k tomuto fragmentu, čímž byl tento fragment konvertován na fragment HindIII obsahující deset bázevých párů nepřeložené 5' lemující sekvence pocházející z kvasinky a byl zvolen úplný otevřený čtecí rámec (ORF) preS2+S tak, aby byl terminační kodon přímo připojen k přírodnímu místu HindIII v transkripčním terminátoru ADH1, za vzniku spojovníku kompletně odvozeného z nativní kvasinky, bez obsahu jakýchkoliv přídavných intervenujících bází. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že pro expresi povrchových proteinů HBV a podobných proteinů se může místo ADH1 použít jakéhokoliv vhodného terminátoru transkripce, který je aktivní v kvasinkách.

5'lemující oblast pro konstrukci

ACAAAACAAA (SEQIDNO: 1)

1 10

byla zvolena tak, aby odpovídala sekvenci nepřeložené vedoucí sekvence (NTL) kvasinkového genu GAP63 (GAP) [Holland J. Biol. Chem., 225, 2596 (1980)] a rovněž vykazovala souhlas s genovou rodinou GAP. Konstrukce byla zhotovena takovým způsobem, aby byla sekvence NTL přímo připojena k iniciačnímu kodonu otevřeného čtecího rámce (ORF) preS2+S, bez intervence jakýchkoliv přídavných bází. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že pro expresi povrchových proteinů HBV se selekce sekvencí NTL vztahuje i na jiné sekvence, které vznikají ve vhodné exprimované koncentraci.

Při analýze sekvence DNA byly odhaleny dvě substituce bází, které mají za následek rozdílnosti v aminokyselinách ve srovnání se sekvencí preS2+S kódovanou DNA pHB preSGAP347/19T [Valenzuela a další, Biotechnology 3 (4), 317 až 320 (1985)]. Pro vyhodnocení identických polypeptidů u obou konstrukcí byly místně orientovanou mutagenesí změněny tyto nukleotidové substituce, které byly T místo C v bázi 64 846bp ORF HBV preS2+S (kódující Phe místo Leu) a C místo A v bázi 352 (kódující His místo Gln) [Zoller a další, Nucleic Acids Research 10: 6487 až 6500 (1982)]. Potom byla ověřena kódovaná sekvence aminokyselin pro optimální konstrukci. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že se vynález neomezuje na tuto sekvenci, nýbrž že se vztahuje na všechny sekvence, v nichž DNA kóduje polypeptidy s antigenicitou mající vztah k HBV.

Z DNA fragmentu kódujícího PreS2 byl po štěpení EcoRI a StyI a purifikaci preparativní elektroforézou na agarosovém gelu oddělen velký fragment DNA (3,3 kbp), který obsahuje pUC19 a oblast kódující HBsAg. Syntetický oligonukleotid DNA byl potom ligován s fragmentem pUC19-HBsAg. Tento syntetický oligonukleotid DNA obsahuje lepivá místa 5' EcoRI a 3' StyI a poskytuje místo HindIII bezprostředně následující za místem 5' EcoRI. Kromě toho obsahuje syntetický oligonukleotid DNA HBsAg ATG kodon, 9-nukleotidů před ním a 21 nukleotidů za ním, včetně místa StyI.

Tento oligonukleotid znovu vystaví úplnou kódující oblast HBsAg a umožňuje její následující odstranění v neporušeném stavu z vektoru na bázi pUC19 štěpením HindIII.

DNA fragment pUC19-HBsAg s ligovaným syntetickým oligonukleotidem DNA popsáným výše byl použit pro transformaci E. coli. Selekcí byly odděleny rekombinantní plasmidy, které obsahují úplně rekonstruovanou kódující

oblast pro HBsAg. Z rekombinantního plasmidu byl štěpěním HindIII a následující izolací a purifikací 0,7kbp HBsAg DNA preparativní elektroforézou na agarosovém gelu odstraněn úplný otevřený čtecí rámec HBsAg, za účelem klonování do expresního vektoru promotoru GAL10.

Expresní kazeta (pGAL10-tADH1) vyvolává expresi cizích genů vložených do jediného místa HindIII za galaktosou indukovatelným promotorem GAL10. Otevřený čtecí rámec HBsAg (s koncovými místy HindIII) popsany výše byl ligován do místa HindIII tohoto vektoru. Tato expresní kazeta byla vložena mezi místa SphI shuttle vektoru pCl/1, (Beggs, viz výše uvedená citace) a tento vektor byl uведен do kmenů *S. cerevisiae* CF52 nebo CF54 a transformované klony byly selektovány.

Po mutagenesi bylo fragmentu kódujícího buď S nebo preS+S, popsaného výše, použito pro konstrukci expresní kazety, která byla nedávno popsána [Kniskern a další, Gene 46: 135 až 141 (1986)], která se skládá z a) asi 1,1 kbp promotoru GAP491, b) 10bp lemující sekvence, která pochází z kvasinky, c) 1230 bp virového otevřeného čtecího rámce pro preS1+preS2+S nebo 846 bp virového otevřeného čtecího rámce pro preS2+S nebo 681 bp virového otevřeného čtecího rámce pro S a d) 0,4 kbp kvasinkového terminátoru ADH1.

Pro konstrukci expresních kazet HBsAg bylo použito tří různých expresních vektorů. Expresní kazeta promotoru GAP 491 popsaná výše [Kniskern a další, 1986, Gene 46, str. 135 až 141] se skládá z asi 1,1 kbp promotoru glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (GAPDH) a asi 350 bp terminátoru kvasinkové alkohol dehydrogenasy 1 (ADH1) v hlavním řetězci pBR322, s jediným místem HindIII mezi promotorem a terminátorem. Otevřený čtecí rámec HBsAg z příkladu 2 byl ligován do jediného místa HindIII a jeho přítomnost a orientace byly

potvrzeny analýzami restriční endonukleasou a metodou Southern Blot.

Alternativně bylo ve shora uvedené konstrukci použito 0,5 kbp promotoru GAL10 [Schultz a další, 1987, Gene 54, str. 113 až 123] místo 1,1 kbp promotoru GAP nebo 1,25 kbp promotoru ADH2 [Kniskern a další, 1988 Hepatology 8, 82 až 87] místo promotoru GAP (viz obr. 1). V každém z těchto případů byla expresní kazeta obsahující specifický promotor, otevřený čtecí rámec HBsAg a terminátor ADH1 klonována do shuttle vektoru PCL/1 [Beggs, viz výše uvedená citace; Rosenberg a další, viz výše uvedená citace], za vzniku kvasinkového expresního vektoru, kterého potom bylo použito pro transformaci *S. cerevisiae*, jak je to popsáno dále. Pro další vyhodnocování a další experimenty byly tyto transformanty uchovávány ve formě zmrazených zásobních vzorků.

Rodičovský kmen CF52 byl získán takto: párovací kmen α -typu, CZ5/LB347-1C ($mnn9^-$, $SUC-Z^-$) byl párován s kmenem a -typu, 2150-2-3 ($leu2^-$, $adel^-$) smísením obou kmenů v misce s úplným médiem YEHD. Za účelem selekce diploidů byly párované kmeny replikovány na misky s leu^- minimálním médiem obsahujícím 2 % sacharosy jako jediný zdroj uhlíku. Po izolaci jednotlivých kolonií byly diploidy sporulovány a jejich asci byly standardní technikou rozříznuty. Kmen KHY-107 byl izolován jako jediná spora a charakterizován jako cir^+ , $adel^+$, $leu2^-$ a $mnn9^-$ (technikou Schiffova barvení). Kmen KHY107 (cir^0) byl odvozen od kmene KHY-107 (cir^+) způsobem popsaným v Broach, Methods in Enzymology 101, část C, str. 307 až 325 (1983). Opravený kmen byl převeden na $ura3^-$ integrací rozštěpeného genu $ura3$. Výsledný kmen KHY-107 $ura3\delta$ byl pěstován na bohatých médiích, aby se umožnila akumulace spontánních mutací. Selektován byl kanavanin-resistentní mutant. Komplementačními testy se potvrdilo, že mutantní kmen CF55

má povahu $can1^-$. Expresní kazeta GAL10pGAL4 byla integrována do genu His3 CF55 [Methods in Enzymology, 1990, 185, str. 297 až 309], za vzniku finálního hostitelského kmene CF52 (Mata leu2-2,112 ura3delta $can1$ his3delta::GAL10pGAL4-URA3, cir^0). Pro další vyhodnocování a další experimenty byly kmeny CF52 a- CF55 uchovávány ve formě zmrazených zásobních vzorků.

Rekombinantní kvasinka ze zmrazeného zásobního vzorku byla kultivována v médiu YEHD [Carty a další, J. Industrial Micro. 2, 117 až 121 (1987)]. Buňky byly sklizeny, když růst dospěl do stacionární fáze. Byly vyrobeny lysáty, které byly rozděleny elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s natriumdodecylsulfátem (SDS-PAGE) a imunoblotovány s protilátkami proti HBsAg. V souladu s předpovězenou molekulovou hmotností translačního produktu otevřeného čtecího rámce proteinu S byl nalezen jeden polypeptid s molekulovou hmotností přibližně 24 kD. Kromě toho lysáty rekombinantní ale nikoliv rodičovské kvasinky jsou pozitivní na S při radioimunostanovení (AUSRIA^(R)). Elektronovou mikroskopií s v částečně purifikovaných kvasinkových lysátech zjistí vysoká hustota typických částic HBsAg.

Promotor aktivní v kvasince iniciuje transkripci HBsAg a příbuzných genů. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že místo promotoru GAP491 je možno použít jakékoliv promotorové sekvence aktivní v kvasinkách (jako jejich neomezující příklady lze uvést GAL1, GAL10, ADH2, Pho5 atd). Odborníkům v tomto oboru je také zřejmé, že aby bylo možno optimalizovat dobu sklizně kultury, za účelem dosažení maximálního výtěžku, mělo by se používat vhodného zkušebního systému, například imunoblotové metody nebo RIA nebo imunoeseje svázaného s enzymem (EIA-enzyme-linked immuno-assay) ke stanovení exprese HBsAg a příbuzných polypeptidů v tomto systému.

Promotor GAP491 se ukázal být užitečný při expresi několika cizích proteinů v kvasinkách, včetně HBsAg [Bitter a další, Gene 32: 263 až 274 (1984); Wampler a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, str. 6830 až 6834 (1985)]. Na základě našich dřívějších výsledků při expresi HBsAg s obsahem až do asi 40 % rozpustného kvasinkového proteinu (Kniskern a další, viz výše uvedená citace) bylo tohoto promotoru použito pro vyvolání exprese HBsAg a příbuzných proteinů ve vhodných hostitelských kvasinkových buňkách.

Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že vhodný kvasinkový kmen pro expresi povrchových proteinů HBV je možno volit ze široké palety kandidátů. Vhodné kvasinkové kmeny zahrnují, i když na ně nejsou omezeny, kmeny s genetickými a fenotypickými charakteristikami, jako jsou proteasové deficiencie a změněná schopnost glykosylace.

Za účelem kontroly a definice glykosylace rekombinantních proteinů HBV exprimovaných kvasinkami byl výše uvedeným způsobem zkonstruován kmen *S. cerevisiae* CF52 (Mata leu2-2, 112 ura3delta can1 his3delta:: GAL10pGAL4-ura3, cir⁰).

Expresního plasmidu pCl/lpGAL10HBsAg-tADH-1 bylo použito pro transformaci CF52 (Mata leu2-2, 112 ura3delta can1 his3delta:: GAL10pGAL4-ura3, cir⁰). Transformované klony byly selektovány na minimálním mediu (leu⁻) obsahujícím 1M sorbitol. Tyto klonované transformanty byly uloženy ve formě zmrazených zásobních vzorků v 17% glycerolu pro další vyhodnocování a další pokusy.

Také byl vyroben glykosylovaný kontrolní vzorek divokého typu. Přitom se také použilo expresního plasmidu a transformován byl kvasinkový kmen CF54, který byl izolován standardními technologiemi z kmene CF52. Tento kmen se spontánně vrací na typ mnn9+ (a je tedy divokým typem, pokud

se týče glykosylace, ale jinak má stejný genotyp jako kmen CF52). Transformované klonové izoláty se uloží ve formě zmrazených vzorků v 17% glycerolu pro další vyhodnocovací a experimentální práce.

Klony transformované kvasinky obsahující expresní plasmidy byly nanесeny na misky s leu⁻ selektivním agarem (obsahujícím 1M sorbitol, v případě mn 9- transformantů. Inkubace se prováděla po dobu 2 až 3 dnů při 30 °C. Tato kvasinka byla inokulována do 5 až 7ml kultur s komplexním YEHD mediem (Carty a další, viz výše uvedená citace), přičemž toto medium obsahovalo 0,1M až 1M sorbitol a 2 % galaktózy, v případě plasmidů na bázi GAL10. Kultury byly inkubovány při 30 °C po dobu 12 až 18 hodin za současného provdušňování.

Výše uvedených kultur bylo použito k zaočkování nádob obsahujících vždy 50 ml komplexního YEHD media s 1M sorbitolem (toto medium je dále označováno zkratkou YEHDS). Inokulace se prováděla na počáteční hodnotu $A_{600} = 0,1$ a kultury se inkubovaly při 30 °C za současného třepání při frekvenci otáčení třepačky 350 min^{-1} po dobu 48 až 72 hodin, až do finální hodnoty $A_{600} = 10$ až 16. Vzorky z deseti jednotek A_{600} byly uloženy do zkumavek a kvasinkové buňky byly peletizovány 10minutovým odstředováním při $2000 \times g$.

Zkoušení vzorků bylo prováděno buď ihned nebo se vzorky uložily ve zmrazeném stavu při -70 °C. V době zkoušení byly pelety resuspendovány v 0,4 ml fyziologického solného roztoku pufrovaného fosfátem (PBS) s obsahem 2mM fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) a suspenze byly převedeny do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek. Kvasinkové buňky byly rozbity 1) přidavkem 200 až 300 mg omytých skleněných perel (o průměru 0,45 mm) a následujícím mícháním ve vířivém mixeru po dobu 15 minut, 2) přidavkem povrchově aktivní

látky TRITON X-100 do koncentrace 0,5 %, 3) dvouminutovým mícháním ve vířivém mixeru a 4) desetiminutovou inkubací při 4 °C. Rozdrcené zbytky buněk a skleněné perly byly odděleny a v supernatantu byl stanoven protein [metodou podle Lowry a další, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)] a provedlo se stanovení RIA, které je specifické pro preS2+S [Hansson a další, Infect. Immunol., 26: 125-130 (1979); Machida a další, Gastroenterology 86: 910 až 918 (1984)] nebo pro S (AUSRIA).

Klony transformované kvasinky *mnn9-* obsahující expresní plasmidy byly naneseny na misky s leu-selektivním agarem s obsahem 1M sorbitolu a kultury byly 2 až 3 dny inkubovány při 30 °C. Tato kvasinka byla inokulována do 5 až 7ml kultur s komplexním YEHD5 médiem, které rovněž obsahovalo 2 % galaktosy pro plasmidy s promotorem GAL10. Inokulace byla prováděna na počáteční hodnotu $A_{600} = 0,1$ a kultury byly inkubovány při 30 °C za současného třepání při frekvenci otáčení třepačky 350 min^{-1} po dobu 48 až 72 hodin, až do finální hodnoty $A_{600} = 10$ až 16. Třikrát replikované vzorky z deseti jednotek A_{600} byly uloženy do zkumavek a kvasinkové buňky byly peletizovány 10minutovým odstředováním při 2000 x g. Zkoušení vzorků se provádělo buď ihned nebo se vzorky uložily ve zmrazeném stavu při -70 °C.

Imunoblotové analýzy polypeptidu získaného ze všech rekombinantních klonů popsanych výše v hostitelských buňkách *mnn9-* fenotypu vykazovaly jeden pás se zdánlivou molekulovou hmotností asi 24 kD.

U rekombinantních proteinů je kvalitativní a kvantitativní profil glykosylace funkcí, která je značně závislá na druhu hostitelské buňky a v rámci jednoho druhu na buněčné linii. Odborníkům v tomto oboru je proto zřejmé,

že volba hostitelského kmene se vztahuje i na druhy a buň-
něčné linie odlišné od *S. cerevisiae*, pro něž lze iden-
tifikovat mutace enzymů na glykosylační dráze. Odborníkům je
také rovněž zřejmé, že volba hostitelských kmenů *S.*
cerevisiae se vztahuje na všechny kmeny, u nichž lze
identifikovat mutace enzymů na glykosylační dráze.

Transformované klony byly potom podrobeny skríningu
na přítomnost HBsAg DNA a expresi p24 HBsAg. Buňky byly
ponechány růst na mediu YEHDs, které také obsahovalo
galaktosu pro plasmidy s promotorem GAL10, za účelem indukce
exprese po vyčerpání glukosy. Vyrobity se lysáty, ty se
rozdělily elektroforézou na polyakrylamidovém gelu
s natriumdodecylsulfátem (SDS-PAGE) a blotovaly se (Western
Blot) na nitrocelulózu. Bylo zjištěno, že produkt p24 je
specifický na protein S, jelikož je přítomen pouze
v indukovaných transformantech a je reaktivní se sérem
anti-p24. Jeden z těchto klonů byl zvolen pro další analýzu.
Kromě toho, lysáty transformantů, ale nikoliv rodičovský
kmen *S. cerevisiae*, byly pozitivní na HBsAg při
radioimunostanovení.

Tento výsledek jasně ukazuje užitečnost expresního
vektoru, který používá promotoru GAL10 pro řízení exprese
HBsAg a podobných povrchových proteinů v *S. cerevisiae*.
Odborníkům v tomto oboru je jasně zřejmé, že regulační
promotor GAL10 nebo promotory GAL1, GAL2, GAL7 nebo MEL1,
které působí nerozlišitelným způsobem, umožňují přenést růst
rekombinantní kultury *S. cerevisiae* do produkčního měřítka
před zahájením syntézy rekombinantního proteinu tak, aby
byly negativní účinky na hostitelskou buňku minimalizovány.
Dále je odborníkům v tomto oboru zřejmé, že pro přímou
expresi peptidů obsahujících S a preS je možno použít
expresního vektoru obsahujícího jiný regulační promotor
(včetně ADH2 a faktoru α -párování, na něž se však vynález

neomezuje), který je fyziologicky indukovatelný a u něhož lze zajistit derepresi jinými prostředky. Odborníkům je také zřejmé, že konstitutivní promotor, který je méně účinný než GAPDH, jako jehož neomezující příklad je možno uvést CYC1, vyvolává expresi polypeptidů obsahujících S a preS do nižšího procentického obsahu buněčného proteinu, takže se lze vyhnout negativním fyziologickým účinkům, které jsou způsobeny nadexpresí. Odborníkům v tomto oboru je také zřejmé, že aby bylo možno optimalizovat dobu sklizně kultury, za účelem dosažení maximálního výtěžku, mělo by se používat vhodného zkušebního systému, například Western Blot nebo radioimunoeseje pro stanovení exprese polypeptidů s obsahem S a preS v tomto systému.

Pro purifikaci proteinu S nebo podobného proteinu z transformované kvasinky *S. cerevisiae* bylo použito imuno-afinitního sloupce s navázanými kozími protilátkami, které rozeznávají částicovou formu HBsAg. Eluovaný produkt je při radioimunoeseji pozitivní na HbsAg a při pozorování elektronovou mikroskopií jeví částicovou formu. Taková částicová forma, která zahrnuje jak HBsAg tak antigeny preS nebo samotný HBsAg, je účinná jako očkovací látka proti HBV a diagnostické činidlo.

Byly vypěstovány a sklizeny kvasinkové buňky transformované expresními vektory kódujícími povrchový protein viru Hepatitis B nebo jeho varianty. Je-li to zapotřebí, je možno buňky skladovat tak, že se promyjí roztokem pufru, například PBS, zpracují se na buněčnou pastu a ta se zmrazí, obvykle na teplotu -70°C .

Purifikace HBsAg a příbuzných proteinů obvykle začíná takto: dávka čerstvé nebo zmrazené buněčné pasty se suspenduje v pufru, přednostně TRIS, o vysoké hodnotě pH v rozmezí od asi 8,5 do asi 11,0, přednostně asi 10,5 (přičemž

pufr může také obsahovat vhodné inhibitory proteasy). Potom se buňky rozbijí, přednostně mechanickými prostředky. Zjistilo se, že jemný způsob rozbíjení pomocí perel není vhodný pro použití ve velkém měřítku. Přednost se dává rozbíjení buněk ve vysokotlakém homogenizátoru (který pracuje přibližně za tlaku 68,7 až 137,4 MPa). Použít se může například Gaulinova nebo Stanstedova homogenizátoru. Použití homogenizátoru se dává přednost, poněvadž rozbíjení buněk je účinné a rychlé.

Při rozbití kvasinkových buněk vzniká surový extrakt. Hodnota pH surového extraktu se nastavuje v rozmezí 8,0 až 11,0, přičemž hodnotě 10,5 se dává přednost.

V tomto okamžiku může být výhodné přidávat k surovému extraktu detergent. Přídavek detergentu usnadňuje oddělování membrán kvasinkových buněk od nežádoucích rozdrčených buněk. Ukázalo se, že protein preS2+S, jakož i jiné formy povrchových proteinů, se mohou asociovat s membránami kvasinkových buněk. Může se používat různých neutrálních nebo neiontových detergentů, jako jejichž neomezující příklady je možno uvést detergenty ze série TRITON-N, série TRITON-X, série BRIJ, série TWEEN nebo série EMASOL, deoxycholát, oktylglukopyranosid nebo NONIDET-Np-40. Užitečným a vhodnými činidly jsou též detergenty s amfoterními ionty (zwitterionty), jako je CHAPS nebo CHAPSO.

Jestliže se má použít detergentu, je jím přednostně TRITON X-100 v koncentraci přibližně 0,5 %. Je třeba zdůraznit, že způsob podle vynálezu v tomto stupni nutně nevyžaduje použití detergentu a použití detergentů není proto obligatorní.

Pokud nebyly v průběhu lyse přidány inhibitory proteasy, může se potom extrakt tepelně zpracovat. Tepelné

zpracování je účinné v určitém rozmezí teplot a délky trvání. Obvykle se používá teploty v rozmezí od 45 do 60 °C, přičemž přednostní teplotou je teplota 50 °C. Doba tepelného zpracování obvykle leží v rozmezí od 20 do 40 minut, přičemž přednostní doba činí 30 minut. Extrakt se tepelně zpracovává ve vhodné nádobě. Tato nádoba se buď ponoří do zahříváné lázně nebo se používá výměníku tepla. Potom se látka ochladí na asi 10 °C, přednostně tak, že se umístí do lázně s ledovou vodou nebo se použije výměníku tepla. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že při tomto způsobu podle vynálezu se může pořadí, v němž se provádějí stupně tepelného zpracování a odstraňování zbytků buněk, obrátit, aniž by to mělo podstatný účinek na výsledek celého postupu. Alternativně se může postupovat tak, že se celé kvasinkové buňky zahřívají v pufru s neutrálním pH, potom se buňky rozbijí a přidá se detergent, jak to bylo popsáno výše.

Odstranění zbytků buněk z tepelně zpracovaného surového extraktu je nutné, aby se zabránilo fyzikální okluzi v průběhu následujících purifikačních stupňů. Zbytky buněk je možno odstranit odstředováním, mikrofiltrací nebo filtrací a tak se získá čirý extrakt. Největší přednost se z těchto metod dává odstředování a mikrofiltraci. Odstředování se může provádět po různou dobu při různých odstředivých silách. Zjistilo se, že patnáctiminutové odstředování při asi 3000 x g při 4 °C je dostačující. Také může být výhodné extrakt před odstředováním zředit, aby se snížila typicky viskózní povaha surového extraktu z kvasinkových buněk. Zředění nenaruší žádný z následujících stupňů tohoto postupu.

Mikrofiltrace má výhodu v tom, že filtraci a dialýzu je možno provádět současně. Pro použití v tomto stupni se hodí několik typů mikrofiltračních jednotek, například KROSFLO, výrobek firmy Microgon Inc. nebo

jakákoliv z různých patron s dutými vlákny, vyráběná firmou Amicon nebo A/G Technology. Přednostní mikrofiltrační metoda spočívá v průchodu extraktu přes membránu Prostack Durapore (Millipore) miskové nebo rámové mikrofiltrační jednotky, přičemž membrána má velikost pórů v rozmezí od asi 0,1 do asi 0,2 μm a jednotka pracuje za vstupního tlaku asi 13,74 až asi 48,1 kPa, za použití pufru obsahujícího přibližně 0,1M TRIS o pH asi 10,4 a asi 0,1 % detergentu TRITON X-100.

Před prováděním následujícího stupně tohoto postupu se může supernatant z odstředování nebo filtrát z mikrofiltrace zkoncentrovat. Koncentrační postup se může provádět různými metodami, jako jejichž neomezuující příklady lze uvést dialýzu, filtraci, lyofilizaci, ultrafiltraci a diafiltraci. Přednostní koncentrační metoda při způsobu podle vynálezu spočívá v průchodu vyčereného extraktu ultrafiltračním systémem s dutými vlákny s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10^5 . Objem vyčereného extraktu se typicky snižuje asi 6,5 násobně, v případě produktu z mikrofiltrace, a asi dvojnásobně, v případě zředěného produktu z odstředování, přičemž se získává zkoncentrovaný retentát. Po této koncentraci se retentát diafiltruje, aby se dále odstranily nečistoty s nižší molekulovou hmotností. Diafiltrace se provádí za použití systému s dutými vlákny s vylučovací mezí molekulové hmotnosti přibližně 10^5 .

Pokud byl přidán detergent TRITON X-100, může se odstranit různými konvenčními metodami, jako jejichž neomezuující příklady je možno uvést dialýzu, přidavek určitých organických rozpouštědel, vymrazování, chromatografické oddělování a kontaktování s gelem nebo pryskyřicí, která specificky váže detergenty, jako je Extractogel (Pierce) a pryskyřice XAD (Romicon). Při přednostním způsobu provedení tohoto vynálezu se detergent TRITON X-100 odstraňuje tak, že se nechá tepelně zpracovaný extrakt s obsahem TRITON X-100

cirkulovat patronou obsahující pryskyřici XAD-2 nebo XAD-4 (polystyren-divinylbenzenová pryskyřice). Tepelně zpracovaný extrakt se nechá cirkulovat náplní XAD po dobu asi 10 hodin při 4 °C a potom se shromáždí ve vhodné nádobě, například uzavíratelné skleněné láhvi.

Pokud byly buňky rozbity v pufru o vysoké hodnotě pH, nastaví se hodnota pH tepelně zpracovaného extraktu nebo extraktu obsahujícího inhibitory proteasy v této době na hodnotu v rozmezí od 7,0 do 7,9, přičemž hodnotě pH přibližně 7,7 se dává přednost. Úpravou pH na asi 7,7 po tepelném zpracování, které bylo prováděno v souladu se způsobem podle vynálezu při vysoké hodnotě pH, se velmi usnadní adsorpce obalových proteinů na široké póry oxidu křemičitého, kterého se používá v následujícím stupni. Přizpůsobení pH tepelně zpracovaného extraktu se může provádět před stupněm odstraňování detergentu TRITON X-100, aniž by to nějak ovlivnilo výsledek celého postupu. Odborníkům v tomto oboru je tedy zřejmé, že při tomto způsobu podle vynálezu se může poradí stupňů, v nichž se provádí úprava pH a odstraňování detergentu TRITON X-100, obrátit, aniž to má podstatný účinek na výsledek celého postupu.

Potom se může HBsAg snadno oddělit od nečistot, za vzniku v podstatě purifikovaného HBsAg. Přednostní metodou odstraňování nečistot je adsorpce HBsAg na oxid křemičitý se širokými póry. Největší přednost se podle vynálezu dává metodě, při níž se HBsAg adsorbuje na široké póry oxidu křemičitého, tj. na oxid křemičitý s průměrem pórů v rozmezí od asi 100 do asi 150 nm a velikostí částic v rozmezí od asi 30 do 130 μm (Amicon). Povrchový protein snadno vstupuje do pórů tohoto oxidu křemičitého a zůstává v nich zadržen. Nečistoty kvasinkového buněčného proteinu je proto možno snadno vypláchnout.

Adsorpce povrchového proteinu na oxid křemičitý se širokými póry se může provádět chromatografickým postupem nebo nechromatograficky diskontinuálním postupem.

Chromatografická adsorpce se provádí tak, že se extrakt s nastavenou hodnotou pH nechá procházet ložem oxidu křemičitého se širokými póry uloženého v zařízení pro sloupcovou chromatografii. Obvykle se asi 1 litr tepelně zpracovaného extraktu aplikuje na pěticentimetrovou kolonu s duplikátorovým pláštěm obsahující asi 300 ml (asi 100 g sušiny) perel oxidu křemičitého se širokými póry, při průtokové rychlosti asi 200 ml/h.

Nechromatografická adsorpce na široké póry oxidu křemičitého se obvykle provádí tak, že se tepelně zpracovaný extrakt smíchá ve vhodné nádobě, například uzavíratelné skleněné láhvi s oxidem křemičitým. V přednostním provedení se asi 300 ml oxidu křemičitého se širokými póry přidá k asi 1 l tepelně zpracovaného extraktu ve skleněné láhvi a směs se udržuje za konstantního míchání přednostně po dobu asi 1,5 hodiny při teplotě v rozmezí od asi 4 do asi 8 °C. Může se však použít i jiné kontaktní doby a jiné teploty.

Promývání oxidu křemičitého s adsorbovaným povrchovým proteinem, kterým se odstraňuje neadsorbovaná látka, se také může provádět nechromatograficky. Oxid křemičitý se však také může uložit do kolony a promývání se může provádět v zařízení pro chromatografickou adsorpci. Diskontinuální promývání se provádí tak, že se tepelně zpracovaný extrakt nechá vytéci ze širokých pórů oxidu křemičitého a potom se přidá několik objemů pufru, který nezpůsobí uvolnění HBsAg adsorbovaného na oxidu křemičitém. Přednostním pufrem je PBS. Vypuštění kapalné fáze z oxidu křemičitého a promývací stupně se opakují 3 až 5x.

Chromatografické promývání povrchového proteinu adsorbovaného na oxidu křemičitém se provádí tak, že se ložem oxidu křemičitého nechá proudit PBS průtokovou rychlostí přibližně 200 ml za hodinu tak dlouho, až je extinkce při 280 nm konstantní.

HBsAg se eluuje z promytého oxidu křemičitého se širokými póry pomocí roztoku pufru, jehož hodnota pH je přibližně v rozmezí od 8,5 do 9,0. Povrchové proteiny se přednostně desorbují za použití roztoku pufru obsahujícího přibližně 0,05 M borátu při pH asi 8,7. Desorpce HBsAg se může usnadnit zvýšením teploty v širokém rozmezí. Přednostní teplota při desorpci je asi 55 °C.

Nechromatografická desorpce se provádí tak, že se smíchá 1200 ml 0,05M borátového pufru o pH 8,7 s asi 700 ml promytého oxidu křemičitého se širokými póry s adsorbovanými HBsAg. Desorpce se provádí po dobu asi 25 minut. Eluát se zachycuje a desorpční stupně se dvakrát opakují. Potom se eluát ochladí.

Chromatografická desorpce se provádí tak, že se kolona s duplikátorovým pláštěm obsahující promytý oxid křemičitý zahřeje přibližně na teplotu 55 °C. 0,05M borátový pufr o pH 8,7 se zahřeje na 55 °C a potom se nechá procházet kolonou průtokovou rychlostí 500 ml za hodinu. Eluát se zachycuje a chladí. Objem eluátu je přibližně ekvivalentní objemu tepelně zpracovaného extraktu aplikovaného na oxid křemičitý se širokými póry.

Obvykle je zapotřebí eluovaný HBsAg koncentrovat. Přednostním koncentračním postupem je postup, při němž se eluát nechá procházet diafiltračním systémem s dutými vlákny s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10^5 za použití 0,05M borátového pufru o pH 8,7. Za použití tohoto systému se

objem eluovaného povrchového proteinu obvykle sníží až asi 16x. Diafiltrační retentát se může sterilovat mikrofiltrací, pokud je to zapotřebí.

Obsah uhlohydrátu v HBsAg se stanovuje způsobem, který popsali Dubois M. a další v Anal. Chem. 28, str. 350 (1956). Obecným principem tohoto postupu je, že jednoduché cukry, oligosacharidy, polysacharidy a jejich deriváty, včetně methyletherů, s volnými nebo potenciálně volnými redukčními skupinami poskytují oranžovožluté zabarvení při zpracování fenolem a koncentrovanou kyselinou sírovou. Intenzita vzniklého zabarvení při konstatní koncentraci fenolu je přímo úměrná množství přítomného cukru.

Praktické stanovení obsahu uhlohydrátu ve vzorku povrchových proteinů HBV se provádí tak, že se 1 ml roztoku obsahujícího 10 až 70 μg proteinu umístí do zkumavky. Připraví se serie uhlohydrátových standardů a slepých vzorků. Do každé zkumavky se přidá 1 ml 5% roztoku fenolu, obsah zkumavek se promíchá a potom se přidá 5 ml 96% roztoku kyseliny sírové a obsah zkumavek se znovu promíchá. Zkumavky se udržují 10 minut při teplotě místnosti, jejich obsah se promíchá a znovu se udržují 20 minut při 25 až 30 °C. Zkoušení vzorků se provádí ve spektrofotometru (A_{490} , v případě hexos a methylovaných hexos a A_{480} , v případě pentos, uronové kyseliny a jejich methylovaných derivátů). Obsah uhlohydrátu ve vzorcích HBsAg se stanoví na základě porovnání s uhlohydrátovými standardy.

Výše uvedeným postupem se stanovuje obsah uhlohydrátu v HBsAg vytvořených v rekombinantních kvasinkových buňkách "divokého typu" (CF54) a v HBsAg vytvořeném v rekombinantních kvasinkových buňkách CF52. Na základě těchto výsledků se vydělením množství uhlohydrátu

(v mikrogramech) množstvím proteinu ve vzorku (v mikrogramech) vypočítá poměr množství uhlohydrátu k proteinu v každém vzorku. Výpočtem tohoto poměru se zjistí, že HBsAg produkovaný v rekombinantních kvasinkových buňkách mnn9- konsistentně obsahuje jednu desetinu obsahu uhlohydrátu v HBsAg produkovaném v rekombinantních kvasinkových buňkách "divokého typu". Tyto výsledky ukazují, že HBsAg produkovaný v mutantních kvasinkových buňkách mnn9- má podstatně snížený obsah uhlohydrátu ve srovnání s HBsAg produkovaným v kvasinkových buňkách "divokého typu".

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a v žádném ohledu vynález neomezují. Všechny uváděné citace představují náhradu za přenesení jejich celého textu do popisu tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Klonování HBV DNA do pBR322

Z humánní plasmy (nosiče) se izolují a purifikují "Dánské" (Dane) částice HBV (serotypu adw) a v těchto částicích se pomocí endogenní polymerasy syntetizuje dvouřetězcová DNA způsobem popsáným v Landers a další, J. Virology, 23, 368 až 376 (1977) a Hruska a další, J. Virology 21, (1977). DNA se izoluje po štěpení enzymem Proteinase K v SDS, načež se provede extrakce směsí fenolu a chloroformu a srážení ethanolem. Genomová DNA HBV se štěpí EcoRI, za vzniku jednoho 3,2kbp fragmentu, který se klonuje do místa EcoRI pBR322, za vzniku pHBV/ADW-1. Přítomnost HBV DNA se potvrdí štěpením EcoRI, přenosem Southern Blot na

nitrocelulózu a hybridizací s [^{32}P]-značenými specifickými oligonukleotidovými próbami.

P ř í k l a d 2

Klonování genu preS2+S do expresního vektoru pGAP-tADH-2

Plasmid pHBV/ADW-1 (popsaný v příkladu 1) se štěpí EcoRI a AccI a 0,8kbp fragment se purifikuje preparativní elektroforézou na agarosovém gelu. Také plasmid pUC se štěpí EcoRI a BamHI a lineární vektor se purifikuje preparativní elektroforézou na agarosovém gelu.

Pro rekonstrukci 5'části otevřeného čtecího rámce preS2+S se syntetizuje dvojice oligonukleotidů, které rekonstituují otevřený čtecí rámec před místem EcoRI směrem k ATG prostřednictvím 10bp sekvenční NTL přes místo HindIII do konce EcoRI. Tyto oligonukleotidy mají následující sekvenční sekvence.

AATTCAAGCT TACAAAACAA AATGCAGTGG (SEQIDNO: 4)

1 10 20 30

GTTCGAATGT TTTGTTTTAC GTCACCTTAA (SEQIDNO: 3)

1 10 20 30

Pro rekonstrukci 3'části otevřeného čtecího rámce preS2+S se syntetizuje druhý pár oligonukleotidů, které rekonstituují otevřený čtecí rámec od místa AccI prostřednictvím translačního terminátoru přes místo HindIII do konce BamHI. Tyto oligonukleotidy mají následující sekvenční sekvence:

ATACATTTA AGCTTG (SEQIDNO: 4)

1 10 15

TGTAAATTTC GAACCTAG (SEQIDNO: 5)

10 10 18

Dvojice oligonukleotidů se tepelně hybridizují a potom ligují do vektoru pUC štěpeného EcoRI-BamHI. Výsledný vektor (2,8kbp) se purifikuje preparativní elektroforézou na agarosovém gelu. 0,8kbp fragment EcoRI-AccI, viz výše, se liguje s tímto vektorem. Přítomnost a orientace otevřeného čtecího rámce preS2+S se potvrdí analýzou pomocí restriční endonukleasy a metodou Southern Blot. Analýza sekvence DNA [Sanger a další, 1977] ukazuje dvě substituce bází, které mají za následek vznik aminokyselinových rozdílů ve srovnání se sekvencí kódovanou DNA plasmidu HBpreSGAP347/19T. Pro vyhodnocení identických polypeptidů v obou těchto konstrukcích se místně orientovanou mutagenesí změni tyto nukleotidové substituce, které byly T místo C v bázi 64 (kódující Phe místo Leu) a C místo A v bázi 352 (kódující His místo Gln) [Zoller a Smith, Nucleic Acids Research 10: 6487 až 6500 (1982)].

Plasmid obsahující kódující oblast HBsAg bez kódující oblasti preS2 se zkonstruuje následujícím způsobem: plasmid pUCHBpreS2+S (popsaný výše) se štěpí restričními endonukleasami EcoRI a StyI. Od DNA fragmentu kódujícího preS2 se oddělí velký fragment DNA (3,3kbp), který obsahuje pUC a kódující oblast HBsAg a přečistí se preparativní elektroforézou na agarosovém gelu. Dvojice oligonukleotidů syntetické DNA

```
AATTCAAGCT TACAAAACAA AATGGAGAAC ATCACATCAG
1           10           20           30           40
```

```
GATTC (SEQIDNO: 6)
45
```

```
GTTCGAATGT TTGTTTTTAC CTCTGTAGT GTAGTCCTAA
1           10           20           30           40
```

```
GGATC (SEQIDNO: 7)
45
```

se potom liguje s fragmentem pUCHBsAg. Tato dvojice syntetických oligonukleotidů obsahuje 5' EcoRI a 3' StyI lepivé konce a současně poskytuje místo HindIII, které ihned následuje za místem 5' EcoRI. Kromě toho, dvojice oligonukleotidů syntetické DNA obsahuje kodon HBsAg ATG, před ním nepřeloženou 10bp vedoucí sekvenci a za ním 21 nukleotidů obsahujících místo StyI.

Tento oligonukleotidový pár znovu vystaví úplnou kódující oblast HBsAg a umožňuje její následující odstranění v neporušeném stavu z vektoru na bázi pUC štěpením HindIII.

DNA vektoru pUC-HBsAg s ligovaným oligonukleotidovým párem DNA popsaným výše se použije pro transformaci *E. coli*. Selekcí se oddělí rekombinantní plasmidy, které obsahují úplně rekonstruovanou kódující oblast pro HBsAg. Z rekombinantního plasmidu se štěpením HindIII a následující izolací a purifikací 0,7kbp HBsAg DNA preparativní elektroforézou na agarosovém gelu odstraní otevřený čtecí rámec úplného HBsAg, za účelem klonování do expresního vektoru.

P ř í k l a d 3

Klonování otevřeného čtecího rámce HBsAg do tří různých expresních vektorů

Pro konstrukci expresních kazet HBsAg se použije tří různých expresních vektorů. Nedávno popsaná expresní kazeta s promotorem GAP491 (Kniskern a další, 1986, *Gene* 46, str. 135 až 141) se skládá z asi 1,1kbp glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasového (GAPDH) promotoru a asi 350bp kvasinkového alkohol dehydrogenasového 1 (ADH1) terminátoru v hlavním řetězci pBR322 s jediným místem HindIII mezi

promotorem a terminátorem. Otevřený čtecí rámec HBsAg z příkladu 2 se liguje v jediném místě HindIII a jeho přítomnost a orientace se potvrdí analýzou pomocí restriční endonukleasy a metodou Southern Blot.

Alternativně se 0,5kbp promotorem GAL10 (Schultz a další, 1987, Gene 54, str. 113 až 123) nahradí 1,1kbp promotor GAP ve výše uvedené konstrukci a 1,25kbp promotorem ADH2 (Kniskern a další, 1988, Hepatology 8, 82 až 87) se nahradí promotor GAP (viz obr. 1).

V každém z těchto případů se expresní kazeta obsahující specifický promotor, otevřený čtecí rámec HBsAg a terminátor ADH1 klonuje do shuttle vektoru pCl/1 (Beggs, viz výše uvedená citace; Rosenberg a další, viz výše uvedená citace) za vzniku kvasinkového expresního vektoru, kterého se potom použije pro dále popsanou transformaci kvasinky *S. cerevisiae*.

P ř í k l a d 4

Konstrukce mutantního kvasinkového kmene *S. cerevisiae* CF52 (mnn9-)

Kmen kvasinky *S. cerevisiae* KHY107 (cir⁺, adel⁺, leu2⁻ a mnn9⁻) se zkonstruuje následujícím způsobem. Kmen α-párovacího typu CZ5/LB347-1C (mnn9⁻, SUCZ⁻) se páruje s kmenem typu "a" 2150-2-3 (leu2⁻, adel⁻) smícháním kmenů na misce s úplným médiem YEHD. Za účelem selekce diploidů se párované kmeny replikují na misky s leu⁻ minimálním médiem obsahujícím 2 % sacharosy jako jediný zdroj uhlíku. Po izolaci jednotlivých kolonií se diploidy sporulují a jejich asci se standardní technikou rozřiznou. Kmen KHY-107 se izoluje jako jediná spora a charakterizuje jako cir⁺, adel⁺, leu2⁻ a mnn9⁻ (technikou Schiffova barvení).

Kmen KHY107 (cir^0) se odvodí od kmene KHY-107 (cir^+) způsobem popsaným v Broach, Methods in Enzymology 101, část C, str. 307 až 325 (1983). Opravený kmen se převede na $ura3^-$ integrací rozštěpeného genu $ura3$. Výsledný kmen KHY-107 $ura3\delta$ se pěstuje na bohatých médiích, aby se umožnila akumulace spontánních mutací. Selektuje se kanavanin-resistentní mutant. Komplementačními testy se potvrdilo, že mutantní kmen CF55 má povahu $can1^-$. Expresní kazeta GAL10pGAL4 se integruje do genu His3 CF55 [Methods in Enzymology, 1990, 185, str. 297 až 309], za vzniku finálního hostitelského kmene CF52 (Mata $leu2-2,112\ ura3\delta\ can1\ his3\delta::GAL10pGAL4-URA3, cir^0$).

P ř í k l a d 5

Transformace kvasinky a zajištění zárodků pro HBsAg v mutantní kvasince CF52 $mnn9^-$

Plasmidu pCl/lpGAL10-HBsAg-tADH-1, popsaného v příkladu 3 se použije ke transformaci kmenu *S. cerevisiae* CF52. Klony se selektují na minimálním mediu (leu^- , s obsahem 1M sorbitolu), uloží se ve formě zmrazených vzorků (v 17% glycerolu) a vyhodnocují se dále popsaným způsobem.

P ř í k l a d 6

Růst a exprese genu HBsAg za promotorem GAL10 v kvasince CF52 ($mnn9^-$)

Klony kvasinky obsahující expresní plasmid popsaný v příkladu 5 se nanosou na misky s leu^- selektivním agarem obsahujícím 1M sorbitol a misky se 2 až 3 dny inkubují při 30 °C. Tato kvasinka se inokuluje do 5 až 7 ml komplexního

YEHD media s 1M sorbitolem (toto medium je dále označováno zkratkou YEHDS) a vzniklé kultury se 12 až 18 hodin inkubují při 30 °C za současného provzdušňování. Nádoby obsahující 50 ml YEHDS se 2 % galaktosy se inokulují výše uvedenou kulturou na počáteční hodnotu $A_{600} = 0,1$ a kultury se inkubují při 30 °C za současného třepání při frekvenci otáčení třepačky 350 min^{-1} po dobu 72 hodin, až do finální hodnoty $A_{600} = 10$ až 16. Vzorky z deseti jednotek A_{600} se uloží do zkumavek a kvasinkové buňky se peletizují 10minutovým odstředováním při 2000 x g.

Zkoušení vzorků se provádí buď ihned nebo se vzorky uloží ve zmrazeném stavu při -70 °C. V době zkoušení se pelety resuspendují v 0,4 ml fyziologického solného roztoku pufrovaného fosfátem s obsahem 2mM fenylmethylsulfonyl-fluoridu (PMSF). Kvasinkové buňky se rozbijí 1) přidavkem 200 až 300 mg omytých skleněných perel (o průměru 0,45 mm), 2) mícháním ve vířivém mixeru po dobu 15 minut, 3) přidavkem povrchově aktivní látky TRITON X-100 do koncentrace 0,5 % objemového, 4) dvouminutovým mícháním ve vířivém mixeru a 5) deseti až patnáctiminutovou inkubací při 4 °C. Rozdrcené zbytky buněk a skleněné perly se oddstředí desetiminutovou centrifugací při 13000 x g. Vyčištěný supernatant se oddělí a stanoví se v něm protein [metodou podle Lowry a další, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)] a HBsAg pomocí zkoušky AUSRIA^(R) (Abbott). Typické výsledky zkoušek jsou uvedeny v následující tabulce.

T a b u l k a I

Popis vzorku (třepací láhve)	AUSRIA ($\mu\text{g}/\text{mg}$) proteinu	rozbíjení buněk	úroveň P24 (imunoblot)
mutant mnn9-	(0,55;0,61;0,53;)	skleněné perly	+++
divoký typ (mnn9+)	(1,8)	skleněné perly	+

P ř í k l a d 7

Kultivace *S. cerevisiae* (mnn9-) produkujícího HBsAg ve velkém měřítku ve fermentorech

Zmrazená kultura rekombinantních kvasinek se inokuluje naisky s leu- agarem s obsahem 1M sorbitolu aisky se v obrácené poloze inkubují 2 až 3 dny při 28 °C. Nárůst na miskách se resuspenduje v YEHDS a resuspendovaný nárůst se převede do dvoulitrové Erlenmeyerovy baňky obsahující 500 ml YEHDS a 2 % galaktosy. Baňka se inkubuje při 28 °C a frekvenci otáčení 350 min⁻¹ v třepaném inkubátoru s kontrolovaným prostředím po dobu 18 až 22 hodin. Těchto očkovacích kultur se potom použije pro inokulaci nádob v produkčním stupni.

Inokulum (1 až 5 % objemových) z jedné nebo více baněk se přenese do 16-litrového nebo 250-litrového fermentoru obsahujícího 10 l nebo 200 l YEHDS. 16-litrové fermentory se provozují při frekvenci otáčení 500 min⁻¹, rychlosti provzdušňování 5 l/min a teplotě 28 °C. 250-litrové fermentory se provozují při frekvenci otáčení 160 min⁻¹, rychlosti provzdušňování 60 l/min a teplotě 28 °C. Sklizeň

se provádí po 40 až 46 hodinách od inokulace očkovací kulturou. Obvykle se dosáhne hodnot optické hustoty 15,0 (jednotky A_{660}). Sklizeň se provádí tak, že se buňky zkoncentrují za použití filtračního zařízení s dutými vlákny, načež se buňky promyjí pufovanými solnými roztoky. Buněčné suspenze se podrobí dále uvedenému zkoušení nebo se skladují ve zmrazeném stavu při -70°C , za účelem dalšího zpracování nebo analýzy.

Malé vzorky (0,6 ml) 20% promytých buněčných suspenzí se rozbijí za použití skleněných perel (průměr 0,45 až 0,52 mm) v 1,5ml Eppendorfových zkumavkách. Jako inhibitor proteasy se přidá PMSF (6,5 μl 200mM zásobního roztoku). Po rozbití buněk se ze zkumavek odeberou alikvotní vzorky, které se zmrazí při -70°C pro imunoblotovou analýzu. Ke zbývajícím částem vzorku ve zkumavce se přidá vždy detergent TRITON X-100 do konečné koncentrace 0,5 %, vzorky se krátce promíchají a 20 až 40 minut inkubují při 4°C . Rozdrcené zbytky buněk se oddělí centrifugací a vyčištěný buněčný extrakt se zkouší na antigen zkouškou AUSRIA^(R), a na protein (Lowry).

P ř í k l a d 8

Purifikace proteinu S v částicové formě pomocí imunitní afinitní chromatografie

Rekombinantní kmen *S. cerevisiae* zkonstruovaný způsobem popsaným v příkladu 5 se kultivuje buď v baňkách nebo ve fermentorech. Kvasinkové buňky se sklídí mikrofiltrací v jednotce Amicon DC-10, suspendují v 30 ml pufru A [$0,1\text{M Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,2, $0,5\text{M NaCl}$] a rozbijí ve Stanstedově tlakové komoře v průběhu sedmi průchodů za tlaku 515,2 až 584 kPa. Suspenze rozbitých buněk (hmotnost vlhkých

buněk 31 g) se zředí 120 ml pufru A, přidá se k ní detergent TRITON X-100 do konečné koncentrace 5 g/l a suspenze se vyčeří centrifugací při 10000 x g po dobu 20 minut při 4 °C. Vyčeřená kapalina se dekantuje a inkubuje se Sepharose 4B s navázanými protilátkami proti HBsAg [McAleer a další, Nature, 307: 178 (1984)] po dobu 19 hodin při 4 °C, aby se antigen adsorboval na pryskyřici. Po této inkubační periodě se suspenze zahřeje na teplotu místnosti, při níž se provádějí všechny další stupně a za vakua odplyní (15 minut). Odplyněná suspenze se nalije do kolony 2,5 x 40 cm. Po úplném naplnění kolony se nenavázaný protein vymyje pufrem A. Antigen se eluuje 3M thiokyanatanem draselným v pufru A. Frakce obsahující antigen se dialyzují proti roztoku 0,007M dinatriumhydrogenfosfátu (Na_2HPO_4) o pH 7,2, 0,15M chloridu sodného při 4 °C a spojí se, za vzniku dialyzovaného produktu obsahujícího 1,08 mg proteinu ve 20 ml. 16 ml tohoto dialyzovaného produktu se zředí na koncentraci 40 µg/ml 5,6 ml 0,006M roztoku Na_2HPO_4 , pH 7,2, 0,15M NaCl. Produkt se sterilizuje filtrací přes membránu Millex-GV (0,22 µm). Identita látky v dialyzovaném produktu se ověří detekcí reaktivity HBsAg pomocí zkoušky AUSRIA^(R).

T a b u l k a I I

Popis vzorku (fermentory)	AUSRIA (µg/mg) proteinu	rozbíjení buněk
mutant mnn9-	(1,13;1,10;1,06;)	skleněné perly
mutant mnn9-	(3,1;4,4;)	Manton-Gaulin
divoký typ	(3,3)	Manton-Gaulin

P ř í k l a d 9

Purifikace rekombinantního HBsAg ve velkém měřítku

Asi 250 g zmrazené buněčné pasty (produkující rekombinantní protein S se resuspenduje na koncentraci 170 g/l (vlhká hmotnost, celkový objem asi 1500 ml) ve fosfátem pufovaném fyziologickém solném roztoku (PBS). Buňky se zahřejí na 45 °C ponořením do vodné lázně. Při této teplotě se buňky udržují po dobu 15 minut a potom se ochladí na ledu na asi 10 °C. Dále se buňky rozbijí dvěma průchody Gaulinovým homogenizátorem.

Po homogenizaci se přidá 10% TRITON X-100 až do konečné koncnetrace 0,3 % a směs se asi 15 minut míší. Buněčný extrakt se odstřeďuje 20 minut při 4 °C a 3600 x g a oddělí se supernatant.

Tento supernatant se pasážíje přes sloupec obsahující asi 200 g pryskyřice XAD-2, aby se odstranil TRITON X-100. Vytékající proud se potom přímo pasážíje přes kolonu obsahující asi 150 g oxidu křemičitého se širokými póry (velikost pórů přibližně 150 nm a velikost částic přibližně 50 µm). Použitá kolona má průměr 5 cm (Pharmacia) a provozuje se při průtokové rychlosti asi 200 ml/h.

Sloupec oxidu křemičitého se promývá PBS tak dlouho, dokud se A_{280} nevrátí na základní linii.

Protein S se ze sloupce oxidu křemičitého eluuje za použití nejprve chladného boritanového pufru (50mM, pH 8,7, 4 °C), při průtokové rychlosti přibližně 500 ml/h tak dlouho, dokud není pozorován nárůst A_{280} . Když A_{280} začne stoupat, kolona se zahřeje na 55 °C a začne se do ní uvádět boritanový pufr o teplotě 55 °C průtokovou rychlostí

přibližně 500 ml/h. Eluát obsahující protein S (přibližně 1 litr) se zachycuje na ledu. Eluát se zkoncentruje přibližně na 200 ml diafiltrací proti 50mM boritanovému pufru o pH 8,7 za použití diafiltrační jednotky s dutými vlákny s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10^5 . Potom se odfiltruje protein S na filtru s otvory $0,2\ \mu\text{m}$ a uloží se. Tento produkt je stálý a není u něj pozorována žádná významná degradace podle analýzy Western Blot.

P ř í k l a d 1 0

Stanovení obsahu uhlohydrátu v rekombinantních povrchových proteinech HBV

Obsah uhlohydrátu v rekombinantních povrchových proteinech HBV se stanovuje způsobem, který popsali Dubois M. a další v Anal. Chem. 28, str. 350 (1956). Obecným principem tohoto postupu je, že jednoduché cukry, oligosacharidy, polysacharidy a jejich deriváty, včetně methyletherů, s volnými nebo potenciálně volnými redukčními skupinami poskytují oranžovožluté zabarvení při zpracování fenolem a koncentrovanou kyselinou sírovou. Intenzita vzniklého zabarvení při konstantní koncentraci fenolu je přímo úměrná množství přítomného cukru.

Při praktickém provedení stanovení obsahu uhlohydrátu v HBsAg produkovaném v kvasinkovém kmeni divokého typu a kvasinkovém kmeni mnn9- se postupuje následujícím způsobem: 1 ml roztoku obsahujícího 10 až 70 μg proteinu se umístí do zkumavky. Připraví se serie uhlohydrátových standardů a slepých vzorků s různým obsahem uhlohydrátu. Do každé zkumavky se přidá 1 ml 5% roztoku fenolu, obsah zkumavek se promíchá a potom se přidá 5 ml 96% roztoku kyseliny sírové a obsah zkumavek se znovu

promíchá. Zkumavky se udržují 10 minut při teplotě místnosti, jejich obsah se promíchá a znovu se udržují 20 minut při 25 až 30 °C. Zkoušení vzorků se provádí ve spektrofotometru (A_{490} , v případě hexos a methylovaných hexos a A_{480} , v případě pentos, uronové kyseliny a jejich methylovaných derivátů). Obsah uhlohydrátu ve vzorcích povrchové proteinu HBV se stanoví na základě porovnání s uhlohydrátovými standardy.

Na základě těchto výsledků se vydělením množství uhlohydrátu (v mikrogramech) množstvím proteinu ve vzorku (v mikrogramech) vypočítá poměr množství uhlohydrátu k proteinu v každém vzorku, který je uveden dále.

Poměr uhlohydrátu k proteinu v HBsAg

kvasinkový kmen	uhlohydrát/protein
-----	-----
mnn9-	0,05
vzhledem ke glykosylaci	
divoký typ (mnn9+)	0,56
-----	-----

Výpočtem tohoto poměru se zjistí, že HBsAg produkovaný v rekombinantních kvasinkových buňkách mnn9- konsistentně obsahuje jednu desetinu obsahu uhlohydrátu v HBsAg produkovaném v rekombinantních kvasinkových buňkách "divokého typu". Tyto výsledky ukazují, že HBsAg produkovaný v mutantních kvasinkových buňkách mnn9- má podstatně snížený obsah uhlohydrátu ve srovnání s HBsAg produkovaným v kvasinkových buňkách "divokého typu".

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace

(i) Přihlašovatel: Kniskern, P. J.
Hagopian, A.

(ii) Název vynálezu: Povrchové protein viru
Hepatitis B,
se sníženým obsahem uhlohydrátu
z hostitele

(iii) Počet sekvencí: 9

(iv) Adresa pro korespondenci:

(A) Jméno: Merck.& Co. Inc.

(B) Ulice: P.O. Box 2000

(C) Město: Rahway

(D) Stát: New Jersey

(E) Země: USA

(F) Poštovní směrovací číslo (ZIP): 07065-0900

(v) strojně čitelná forma:

(A) střední typ: floppy disk

(B) počítač: IBM PC kompatibilní

(C) operační systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) software: PatentIn Release č. 1.0, verze
1,25

(vi) Údaje o současné přihlášce:.

(A) Číslo přihlášky: není k dispozici

(B) Datum podání: není k dispozici

(C) Klasifikace: není k dispozici

(viii) Informace o zástupci:

(A) Jméno: Pfeiffer, Hesna J.

- (B) Registrační číslo: 22 640
- (C) Referenční číslo spisu: 18346

(ix) Telekomunikační informace:

- (A) Telefon: (908) 594-4251
- (B) Telefax: (908) 594-4720

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka 10 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězcovost: jeden řetězec
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:1

ACAAAACAAA

10

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka 30 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězcovost: jeden řetězec
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:2

AATTCAAGCT TACAAAACAA AATGCAGTGG

30

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka 30 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězcovost: jeden řetězec
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO. 3

GTTCGAATGT TTTGTTTTAC GTCACCTTAA

30

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 15 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězcovost: jeden řetězec
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO. 4

ATACATTTAA GCTTG

15

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 18 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězcovost: jeden řetězec

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO. 5

TGTAAATTTC GAACCTAG

18

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 45 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězcovost: jeden řetězec

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO. 6

AATTCAAGCT TACAAAACAA AATGGAGAAC ATCACATCAG GATTTC

45

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 45 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězcovost: jeden řetězec

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO. 7

GTTCGAATGT TTTGTTTTAC CTCTTGTAGT GTAGTCCTAA GGATC

45

(2) Informace o SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 29 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězcovost: jeden řetězec

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO. 8

AATTGTCGAC AGCTAGCTGA ATTCCCGGG

29

(2) Informace o SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 29 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězcovost: jeden řetězec

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO. 9

AGTCCCGGG AATTCAGCTA GCTGTCGAC

29

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Eukaryotický expresní systém pro produkci rekombinantních polypeptidů a proteinů obsahujících sníženou koncentraci uhlohydrátu nebo glykoproteinů z hostitelské buňky.

2. Expresní systém podle nároku 1, kde eukaryotickým hostitelem je kvasinka.

3. Expresní systém podle nároku 2, kde kvasinkovým hostitelem je *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Expresní systém podle nároku 1, kde rekombinantním polypeptidem nebo proteinem je polypeptid nebo protein viru Hepatitis B.

5. Expresní systém podle nároku 4, kde polypeptidem nebo proteinem viru Hepatitis B je obalový polypeptid nebo protein.

6. Expresní systém podle nároku 5, kde polypeptidem nebo proteinem viru Hepatitis B je HBsAg.

7. Povrchový protein viru Hepatitis B vytvářející částice s podstatně sníženým obsahem strženého uhlohydrátu nebo glykoproteinu.

8. Povrchový protein viru Hepatitis B podle nároku 7, produkováný v rekombinantních kvasinkových buňkách, které jsou geneticky deficientní, pokud se týče glykosylace proteinu.

9. Povrchový protein viru Hepatitis B podle nároku 8, kde genetická deficiencie kvasinkové buňky je v genu *mnn9*.

10. Povrchový protein viru Hepatitis B podle nároku 7, kde poměr uhlohydrátu k proteinu v purifikovaném povrchovém proteinu je nižší než 0,5.

11. Očkovací látka proti viru Hepatitis B pro použití u lidí, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje povrchový protein viru Hepatitis B vytvářející částice s podstatně sníženým obsahem strženého uhlohydrátu nebo glykoproteinu.

12. Očkovací látka podle nároku 5 produkovaná v rekombinantních kvasinkových buňkách, které jsou geneticky deficientní, pokud se týče glykosylace proteinu.

13. Očkovací látka podle nároku 12, kde genetická deficiencie je v genu *mnn9*.

14. Očkovací látka podle nároku 11, kde poměr uhlohydrátu k proteinu v povrchovém proteinu je nižší než 0,5.

15. Imunologické diagnostické činidlo, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protein viru Hepatitis B vytvářející částice s podstatně sníženým obsahem uhlohydrátu nebo glykoproteinů stržených z hostitelské buňky, kterýžto protein vykazuje sníženou reaktivitu s přírodně se vyskytujícími proti-kvasinkovými protilátkami.

16. Imunologické diagnostické činidlo podle nároku 15, v němž poměr uhlohydrátu k proteinu v purifikovaném povrchovém proteinu je nižší než 0,5.