



[12] 发明专利申请公开说明书

[11] CN 87 1 02799 A

CN 87 1 02799 A

[43] 公开日 1988 年 1 月 13 日

(21) 申请号 87 1 02799

(22) 申请日 87.4.17

(30) 优先权

(32) 86.4.25 (33) US (31) 856325

(71) 申请人 默克公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 E·戴尔·莱曼 特德·F·谢弗
威廉·J·麦卡里尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 顾柏棣 辛敏忠

(54) 发明名称 用清蛋白聚合的血清亲合结合法纯化
乙型肝炎表面抗原前-S-区

(57) 摘要

重组体前-S-HBsAg 通过快速有效两步层析法纯化。破碎表达重组体前-S-HBsAg 的酵母细胞, 澄清细胞内含物, 用聚合人类血清清蛋白亲合层析分离该内含物, 前-S-HBsAg 进一步用丁基琼脂糖疏水反应层析纯化。这一过程得到高于 90 % 纯度的前-S-HBsAg。

881A00154/02_9

1。一种纯化重组体表达的肝炎 B 病毒前 - S 表面抗原的方法，包括：

- a。将含前 (2) 的抗原连接于聚合的血清清蛋白母体入；
- b。将该抗原从母体上洗脱，用卤代醋酸碱金属盐；及
- c。用丁基琼脂糖亲和层析及一合适的洗脱剂进行最后纯化。

2。据权项 1 所述的方法，在步骤 a 中的清蛋白是人类或黑猩猩的血清清蛋白。

3。据权项 1 所述的方法，在步骤 a 中的清蛋白是人类血清清蛋白。

4。据权项 1 所述的方法，在步骤 a 中的抗原是前 - S (2) - H B _s A g，前 - S (1) S (2) - H B _s A g，前 - S (1) S (2) 或前 - S (2)。

5。据权项 1 所述的方法，在步骤 b 中的碱金属盐是锂，钠或钾盐。

6。据权项 4 所述的方法，其中碱金属是钠。

7。据权项 1 所述的方法，在步骤 b 中有一个，两个或三个卤素分子。

8。据权项 1 所述的方法，在步骤 b 中的卤代醋酸含有三分子的氟、氯、溴、碘。

9。据权项 1 所述的方法，在步骤 b 中的卤代醋酸碱金属盐是三氯醋酸盐。

10。用权项 1 的方法纯化的重组体衍生肝炎 B 病毒前 - S 抗原。

1 1。用权项 1 方法纯化的重组体衍生肝炎 B 病毒前 - S (2)
- H B _S A g。

1 2。用权项 1 方法纯化的重组体衍生的肝炎 B 病毒前 - S
(1) S (2) - H B _S A g。

1 3。用权项 1 方法纯化的重组体衍生肝炎 B 病毒前 - S (1)
S (2)。

1 4。用权项 1 方法纯化的重组体衍生肝炎 B 病毒 p r e -
S (2)。

用清蛋白聚合的血清亲合结合法

纯化乙型肝炎表面抗原前-S-区

本发明涉及纯化酵母表达的重组体前-S-Hepatitis B表面抗原(HBsAg, 前S-肝炎B)的一种快速有效方法。

已证实该表面抗原肝炎B前-S区是病毒受体位点, 在肝炎B病毒进入肝细胞之前, 该区结合于肝细胞, Valenzuela et al, Bio/Technology 3: 317-320 (1985), 该前-S区结合于聚合的血清清蛋白, 认为聚合的血清清蛋白与肝细胞膜有关, 因此, 含有前-S的, 衍生的重组体抗原被称作可诱导抗体的一类抗原, 这些抗体能阻断肝炎B病毒与感受性宿主细胞的接触。肝炎B病毒含有前-S的表面抗原已从感染的人类血浆中分离得到, Neurath and Strick, Arch. Virol 60: 79-81 (1979), 最近并用 Valenzuela, supra 描述的标准重组体技术得到。事实上, Neurath 和 Strick 能采用与人类聚合的血清清蛋白选择性结合的方法从HBeAg阳性人类血清中分离少量HBsAg。该HBsAg可用3M硫氰酸钠从连接了聚合的人类血清清蛋白的琼脂糖柱上洗脱。以此方法得到了25倍到80倍纯化血清HBsAg。然而, 这一程序不能纯化重组体衍生的前-S(2)HBsAg。

重组体前-S-HBsAg用快速有效两步层析方法纯化。破裂表达重组体前-S-HBsAg的酵母细胞, 澄清该细胞内含物并

用聚合的人类血清清蛋白亲和层析法分离。该前-S-HB_sAg可用丁基琼脂糖疏水作用亲和层析进一步纯化。这种方法得到高于90%纯度的前-S-HB_sAg。

因此，本发明目的之一是提供一有效方法以纯化重组体衍生前-S-HB_sAg。另一目的是提供一种方法，其允许快速，高纯度高产率重获前-S-HB_sAg。本发明的这些目的和其它目的可从下文叙述中看出。

本发明涉及一快速两步方法从酵母细胞溶胞产物中分离前-S抗原，在这种酵母细胞中该肽段是用重组体技术产生的。当下列叙述和实例描述与前-S(2)-HB_sAg相关的本发明时，应明了本发明适用于任何含有与肝炎B表面抗原-S区相关的肽段的蛋白质。实例包括重组体衍生的前-S(1)S(2)-HB_sAg，及未与肝炎B病毒表面抗原S区共价结合的前-S(1)S(2)和前-S(2)多肽。

表达前-S(2)HB_sAg的重组体酵母用 Valenzuela et al. 叙述的标准重组技术得到，Bio/Technology，3: 317-320 (1985)，表达前-S(2)-HB_sAg的酵母细胞用 Carty et al 方法生长，Eighty-Fourth ASM Meeting p. 194, 1984，收集这些细胞，离心并重悬于含约0.1M磷酸钠，约PH 7.2，0.5M NaCl的高渗缓冲液，浓度约50%(wt/wt)，贮于-70℃。细胞在约20-23℃时融解，离心并重悬于Breaking缓冲液，其中含约0.1M HEPES，PH 7.5，补充有0.01M EDTA，1μg/ml 抑胃肽，0.13单位/ml aprotinin

0.01 M 苯胺—盐酸及 2 mM 苯基—甲烷，磺酸 (PMSF)。该混合物 1—7 次通过 Stansted 压机以破裂细胞。破裂细胞浆液通过离心 $8,000 \times g$ 45 分钟 4°C 而澄清。

澄清的酵母提取物加入一含有偶联了聚合的人类血清清蛋白 (PHSA) 的 Sepharose 4 B 柱。人类血清清蛋白是按 Machida et al, Gastroent 85: 268—274 (1983) 叙述的方法用戊二醛聚合的，按厂家要求偶联于 CNBr—激活的 Sepharose 4 B。用一合适洗脱液洗，用含 50 mM HEPES PH 7.5 和 0.5 N NaCl 的缓冲液 A 洗，然后将酵母提取液上柱。合适洗脱液包括碱金属的一，二或三卤代醋酸盐。碱金属指锂，钾，其中钠最为常用。卤素指氟，氯，溴和碘，其中氯最常用。因此，最常用为三氯醋酸钠。当所有样品进入柱子，不被吸收的蛋白质就用缓冲液 A 从柱中洗掉。吸收的前—S(2)—HBsAg 用三氯醋酸钠水溶液从 PHSA Sepharose 柱中洗掉，三氯醋酸钠浓度 1 M—3.5 M，最好用 3 M，PH 6—8，最好用 PH 7。PHSA 汞合分离得到 80 倍富集的前—S(2)—HBsAg。聚丙烯酰胺凝胶蛋白质转移和银染证明所分离的组分为前—S(2)—HBsAg，纯度至少为 50%。

该前—S(2)—HBsAg 进一步用丁基 Sepharose (Pharmacia) 层析纯化。特别纯化了的前—S(2)—HBsAg 对 50 mM 3—(N—吗啉) 丙烷磺酸 (MOPS) PH 7.0 透析，泵入丁基 Sepharose 4 B 柱，冲洗该柱，用约 0.1% triton x-100, 50 mM MOPS, PH 7.0 将结合的前

—S(2)—HB_sA_g洗脱,聚丙烯酰胺凝胶的蛋白质转移和银染证明洗脱出的前—S(2)—HB_sA_g组分纯度大于90%。

以下各例用于说明本发明,但不是对本发明的限制。

例 1

用聚合的人类血清清蛋白亲和层析纯化前—(S)—HB_sA_g表达前—S(2)—HB_sA_g的重组体衍生酵母用 Valenzuela et al, Bio/Technology 3: 317—320, 1985, 所述标准重组技术得到,细胞用 Carty et al, Eighty-Fourth ASM Meeting, 1984, Abstr 030, P194, 所述方法生长,浓缩富集,对磷酸盐缓冲液 PH 7.2 透析过滤,离心收集细胞,重悬于高渗缓冲液(0.1 M 磷酸钠, PH 7.2, 0.5 M NaCl),以—50%细胞悬液(Wt/Wt)贮于—70℃。

非特别指明,所有工作均在4℃完成、冰冻细胞悬浮液于20℃融解,至浆液具有半融稠度。细胞悬浮液转移至一已事先称重的离心瓶中,搅动至全部融解。于8000 x g 离心45分钟收集细胞。细胞154 gm(湿重)与250 ml 破碎缓冲液(0.1 M HEPES, PH 7.5, 0.01 M EDTA, 1 μS/ml 抑胃肽A, 0.13 units/ml aprotinin, 0.01 M 苯胺盐酸, 2 mM PMSF)混合准备裂解,细胞均匀分布然后通过—Stansted 压机,80 每平方吋克,10—12 每平方吋克回压。破碎重复四次,8000 x g 离心45分钟收集上清液。

人类血清清蛋白用戊二醛聚合,如Machida et al, Gas-

troentero, 85: 268-74, 1983, 所述, 根据厂家指导偶联于CNBr-活化的 Sepharose 4B (Pharmacia). 制备聚合人类血清清蛋白 (PHSA) 结合 Sepharose 柱, 床体积 64 ml, 用 300 ml 3 M 三氯醋酸钠 PH 7 洗, 再用 700 ml 缓冲液 A 洗, 缓冲液 A 含有 50 mM HEPES, 0.5 M NaCl 和 PH 7.5。

澄清的酵母提取液 440 ml (含 20, 520 mg 蛋白质和 129 mg 前-S(2), HBsAg) 被泵入 PHSA Sepharose 柱, 流速 25 ml/hour, 全部样品进柱后, 用缓冲液 A 洗去未被吸收的蛋白质。前-S(2)-HBsAg 用 3 M 三氯醋酸钠 PH 7 洗脱, 检测和纯度分析前-S(2)-HBsAg 用聚丙烯酰胺电泳然后或银染或免疫转移法完成, 从 PHSA 柱中洗脱出来的组分的重复等分试样在 0.05 ml 缓冲液 (含 2% + 二烷基磺酸钠 (SDS), 0.125 M Tris-HCl, PH 6.8, 100 mM 二硫苏糖醇) 中温育 15 分钟, 100°C。按 Laemmli, Nature 227, 680 (1971) 所述方法将样品通过 12.5% 聚丙烯酰胺分离胶电泳 2.5 小时, 65 mA/gel。一套凝胶按 Morrissey, Anal Biochem 117, 307-310 (1981) 方法用硝酸银染色以看到多肽, 另一套凝胶按 Burnette, Anal Biochem 112, 195-203 (1981) 方法进行免疫转移, 其中兔血清按 Hilleman, et al, Am.J. Med. Sci 270, 401 (1975) 方法制备。洗脱液含 43 mg 蛋白质和 22.1 mg 前-S(2)-HBsAg, 表明根据这项技术富集了 80 倍。

例 2

前-S-HB_SAg的二次纯化.

例1中得到的纯化的前-S(2)HB_SAg, 进一步用丁基 Sepharose (Pharmacia)柱层析纯化. 制备丁基 sepharose 4 B柱, 用 500 ml 50 mM MOPS PH 7.0 (缓冲液 B)洗, 流速 30 ml/hour. 纯化的前-S(2)-HB_SAg 对缓冲液 B 透析, 透近后的抗原, 118 ml 含 41.5 mg 蛋白质和 21.3 mg 前-S(2)-HB_SAg 被泵入该柱. 该柱用缓冲液 B 洗至移去所有未被吸收的蛋白质, 前-S(2)HB_SAg 用含 0.1% Triton x-100 的缓冲液 B 洗脱. 该吸收组分含 13.5 mg 蛋白质和 25 mg 前-S(2)-HB_SAg. 例1中所述的银染和蛋白质转移聚丙烯酰胺凝胶电泳揭示该洗脱组分含有高于 90% 的前-S(2)-HB_SAg.