



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 15 521 T2 2007.06.21

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 421 195 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 15 521.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/KR02/01522

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 755 966.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2003/014360

(86) PCT-Anmeldetag: 09.08.2002

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 20.02.2003

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 26.05.2004

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 18.10.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 21.06.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

2001048373 10.08.2001 KR

(73) Patentinhaber:

Bioleaders Corp., Daejeon, KR; M. D. Lab Co. Ltd.,
Daejeon, KR

(74) Vertreter:

Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(72) Erfinder:

SUNG, Moon-Hee, Yuseong-gu, 305-301 Daejeon,
KR; HONG, Seung-Pyo, Yuseong-gu, 305-751
Daejeon, KR; LEE, Jong-Su, 456-110 Anseong-si,
Gyeonggi-do, KR; JUNG, Chang-Min, 158-811
Seoul, KR; KIM, Chul-Joong, 305-345 Daejeon, KR;
SODA, Kenji, Nankoku-shi, Kochi 783-0093, JP;
ASHIUCHI, Makoto, Uji, Kyoto 611-0002, JP

(54) Bezeichnung: OBERFLÄCHENEXPRESSIONSVEKTOREN MIT pgsBCA, DEM FÜR POLY-GAMMA-GLUTAMAT-SYNTETASE CODIERENDEN GEN, SOWIE VERFAHREN ZUR EXPRESSION EINES ZIELPROTEINS AN DER OBERFLÄCHE EINES DEN VEKTOR BENUTZENDEN MIKROORGANISMUS

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**TECHNISCHES GEBIET**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Expressionsvektoren, die exogene "Ziel"- bzw. "Target"-Proteine effizient auf einer mikrobiellen Zelloberfläche produzieren können und die das Protein der äußeren Zellmembran ("cell outer membrane protein") (pgsBCA), das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, nutzen. Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Exprimieren eines exogenen "Ziel"-Proteins auf einer mikrobiellen Zelloberfläche durch Ausnutzen des Proteins der äußeren Zellmembran (pgsBCA), das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist.

WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

[0002] Vor kurzem ist die Verwendung der Oberflächenexpression zum Produzieren wertvoller exogener Proteine auf Zelloberflächen mit Bakteriophagen, Bakterien und Hefe zum Zweck des Schaffens neuer Vakzine, des Screenens bzw. Durchmusterns verschiedener Arten von Antigenen und Antikörpern und zum Fixieren nützlicher Enzyme auf Zelloberflächen versucht worden.

[0003] Die Idee des Exprimierens exogener Proteine auf einer Zelloberfläche war ursprünglich, antigene Regionen von Peptiden, insbesondere zur großtechnischen stabilen Expression von Vakzinen, zu produzieren. Gegenwärtig werden pathogene Bakterien zufällig mutiert, um Vakzine zu produzieren, und durchmustert, um Bakterien mit beständigen und stabilen Titern zu sammeln. Unglücklicherweise geht jedoch die enzymatische Aktivität nach oraler Verabreichung an Menschen und Tiere ausnahmslos verloren. Deshalb sind etliche Studien durchgeführt worden, um dieses Problem zu überwinden. Normalerweise wird ein Zelloberflächenprotein eines Gram-negativen Bakteriums ausgewählt, und sein Gen wird mit einem antigenen Protein ligiert, welches dann in geeignete Wirtszellen eingeführt wird, so dass Fusionsproteine effizient auf der Zelloberfläche produziert werden. Das rekombinante Protein, das durch dieses Verfahren hergestellt wird, kann ein wirksames Antigen sein, weil es auf die Zelloberfläche hinausgestreckt bzw. vorgeschoben ("protruded") wird. Es ist insbesondere berichtet worden, dass Gram-negative Bakterien zur Produktion am geeignetsten sind, da die Lipopolysaccharide (LPS) in der äußeren Zellmembran die Antigenität der Proteine, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, verstärken.

[0004] Um exogene Proteine auf einer Zelloberfläche zu exprimieren, ist das Vorhandensein eines Sekretionssignals innerhalb der Primärsequenz erforderlich, da dieses die biosynthetisierten Zellproteine durch die Zellmembran führt. Daneben muss das rekombinante Protein bei Gram-negativen Bakterien auch durch die innere Zellmembran und den Raum zwischen den Zellmembranen treten, an der äußeren Zellmembran eingefügt und angeheftet und schließlich stabil auf die Außenseite der Zellmembran hinausgestreckt bzw. vorgeschoben werden.

[0005] Praktischerweise gibt es bestimmte Proteine, die solch ein Sekretionssignal und solch ein Targetierungssignal ("targeting signal") umfassen und stabil auf die Zelloberfläche hinausgestreckt werden, beispielsweise Zelloberflächenproteine, spezifische Enzyme und Toxinproteine. Exogene Proteine als solche können erfolgreich auf einer Bakterienoberfläche exprimiert werden, wenn diese Sekretions- und Targetierungssignale mit einem geeigneten Promotor verbunden sind.

[0006] Im Allgemeinen können die Zelloberflächenproteine, die zur Oberflächenexpression von Fremdproteinen ausgewählt werden, grundsätzlich in 4 Arten unterteilt werden, ein Protein der äußeren Zellmembran, Lipoprotein, Sekretionsprotein und Zelloberflächen-Organprotein ("cell surface organ protein"). Bis jetzt sind die Oberflächenproteine, die in Gram-negativen Bakterien vorhanden sind, beispielsweise LamB, PhoE und OmpA, hauptsächlich eingesetzt worden, um nützliche Fremdproteine zu produzieren. Jedoch stellen diese Proteine strukturelle Beschränkungen hinsichtlich der Größe der inserierbaren Proteine, die in die auf die Zelloberfläche hinausgestreckte Schleife inseriert werden, dar. Da die C- und N-Termini der inserierten exogenen Proteine stereochemisch eng benachbart ("close") sein sollten, können verbundene Peptide ligiert werden, um den Abstand zwischen den zwei Termini zu verringern, wenn sie voneinander entfernt sind ("distant").

[0007] Konkret gesagt, falls LamB und PhoE verwendet werden, um ein exogenes Polypeptid, das aus mehr als 50–60 Aminosäuren besteht, zu inserieren, werden strukturelle Beschränkungen heraufbeschworen, die die Schaffung eines stabilen Proteins auf der Zellmembran verhindern (Charbit et al., *J. Immunol.*, 139: 1658–1664, 1987; Agterberg et al., *Vaccine*, 8: 85–91, 1990). Obwohl OmpA eingesetzt werden kann, um exo-

gene Proteine in die hinausgestreckte bzw. hervorgeschoßene Schleife einzuführen, kann aufgrund der strukturellen Beschränkung tatsächlich nur ein partielles Fragment von OmpA, das ein Minimal-Targetierungssignal enthält, hinzugefügt werden. β -Lactamase ist auf einer Zelloberfläche durch Verknüpfen des OmpA-Targetierungssignals mit dem C-Terminus exprimiert worden.

[0008] Vor kurzem wurde herausgefunden, dass das Ice-Nucleations-Protein ("ice-nucleation protein") (INP), das von *Pseudomonas* sp. abgeleitet ist, eine äußere Zellmembran von Gram-negativen Bakterien ist, und es wurde zur Oberflächenexpression eingesetzt (Jung et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 576–560, 1998; Jung et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 22(5): 348–354, 1998; Lee et al., *Nat. Biotechnol.*, 18: 645–648, 2000). Jung und Kollegen exprimierten Levansucrase auf einer Zelloberfläche, wobei sie das Ice-Nucleations-Protein, bestehend aus dem N-Terminus, der zentralen repetitiven Region und dem C-Terminus, verwendeten und wobei sie das Levansucrase-Gen mit dem C-Terminus ligierten bzw. verbanden, während sie auch Carboxymethylcellulase unter Verwendung des Ice-Nucleations-Proteins, bestehend aus dem N-Terminus, der deletierten zentralen repetitiven Region und dem C-Terminus, und Fusionieren des Gens mit dem C-Terminus exprimierten, um die jeweiligen Enzymaktivitäten zu untersuchen. Zusätzlich dazu verwendeten Lee und Kollegen das Ice-Nucleations-Protein, das gerade den N-Terminus oder den N-Terminus und den C-Terminus, ligiert mit dem Hepatitis-B-Virus-Oberflächen-Antigen und dem Hepatitis-C-Virus-Kern-Antigen an jedem Terminus umfasst, zur Expression auf der Zelloberfläche eines *Escherichia coli*- oder *Salmonella typhi* Ty21a-Stammes, dann bestätigten sie, dass diese Proteine für komplexe Lebendimpfstoffe ("complex live vaccines") wirksam waren.

[0009] Lipoproteine sind auch als ein Oberflächenprotein zur Oberflächenexpression eingesetzt worden. Insbesondere können *E. coli*-Lipoproteine auf der Basis des Sekretionssignals am N-Terminus durch die innere Zellmembran wandern und sie enthalten L-Cystein an dem Terminus, der direkt mit der äußeren Zellmembran oder inneren Zellmembran verbunden ist. Ein bedeutendes Lipoprotein, Lpp, ist mit der äußeren Zellmembran am N-Terminus und mit Peptidoglycan (PG) am C-Terminus assoziiert. Daher können exogene Proteine stabil auf der Zelloberfläche der äußeren Zellmembran exprimiert werden, wenn Lpp mit dem OmpA-Fragment des Proteins der äußeren Zellmembran verbunden wird (Francisco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2713–2717, 1992). Diese Eigenschaft ist auch bei einem weiteren Lipoprotein, TraT, verwendet worden, um Fremdproteine, z.B. das C3-Epitop des Poliovirus, auf einer Zelloberfläche zu exprimieren (Felici et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 301–310, 1991). Darüber hinaus ist das Peptidoglycan-assozierte Lipoprotein (PAL) ausgewählt worden, um rekombinante Antigene durch Oberflächenexpression zu produzieren, obwohl es hinsichtlich seiner genauen Funktion noch nicht aufgeklärt bzw. erforscht wurde (Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369–1372, 1991). In diesem Fall ist der C-Terminus von PAL mit der Zellwand und der N-Terminus mit dem rekombinanten Antikörper ligiert bzw. verbunden, um ein Fusionsprotein auf der Zelloberfläche zu exprimieren.

[0010] Obwohl mittlerweile sogar Sekretionsproteine, die die äußere Zellmembran passieren können, als ein Oberflächenprotein verwendet werden können, ist dies bei Gram-negativen Bakterien noch nicht entwickelt worden, und nur wenige Arten von Sekretionsproteinen können den Durchtritt durch die äußere Zellmembran in der Gegenwart spezifischer Proteine, die am Sekretionsmechanismus beteiligt sind, unterstützen. Beispielsweise wird *Klebsiella* sp. Pullulanase als ein Lipoprotein vollständig in ein Zellkulturmedium sekretiert, nachdem sein N-Terminus mit einer Lipidsubstanz substituiert und an die äußere Zellmembran angeheftet wurde. Kornacker und Kollegen exprimierten β -Lactamase auf einer Zelloberfläche, wenn sie das N-Terminus-Fragment von Pullulanase verwendeten, jedoch wurde das resultierende Fusionsprotein Pullulanase- β -lactamase unverzüglich auf der Zelloberfläche angeheftet, trennte sich dann unglücklicherweise ins Zellkulturmedium ab. Dieses Verfahren ist außerdem auch ausgenutzt worden, um alkalische Phosphatase, ein Protein des periplasmatischen Raums, zu produzieren, jedoch wird das rekombinante Protein nicht stabil exprimiert, da wenigstens 14 Proteine für die Sekretion erforderlich sind (Kornacker et al., *Mol. Microbiol.*, 4: 1101–1109, 1990).

[0011] Darüber hinaus hat IgA-Protease, die von der pathogenen Mikrobe *Neisseria* sp. abgeleitet ist, ein spezifisches Sekretionssystem mit einem Fragmentsignal ("fragment signal"), das am C-Terminus vorhanden ist, welches bewirkt, dass die Protease, die am N-Terminus vorhanden ist, stabil an die äußere Zellmembran angeheftet wird. Sobald sie an der äußeren Zellmembran ankommt und auf der Zelloberfläche hervortritt, wird die Protease auf der Basis ihrer hydrolytischen Fähigkeit in das Zellkulturmedium sekretiert. Klauser und Kollegen exprimierten beständig die B-Untereinheit des Choleratoxins mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa auf einer Zelloberfläche unter Verwendung dieses IgA-Protease-Fragments (Klauser et al., *EMBO J.*, 9: 1991–1999, 1990). Jedoch wurde die Sekretion des fusionierten Proteins durch die Proteinfaltung, die während des Sekretionsvorgangs im Zellmembranraum induziert wurde, inhibiert.

[0012] Außerdem bestehen, im Fall von Gram-negativen Bakterien, die Zell-Unterorgane ("cell suborgans"), die auf der Zelloberfläche vorhanden und zur Oberflächenexpression verwendbar sind, aus Geißeln, Pili und

Fimbrien etc. Genauer gesagt, sind die B-Untereinheit des Choleratoxins und Peptide, die vom Hepatitis-B-Virus abgeleitet sind, beständig unter Verwendung von Flagellin als einer Untereinheit, aus denen Geißeln bestehen, exprimiert und als stark mit ihren Antikörpern bindend identifiziert worden (Newton et al., *Science*, 244: 70–72, 1989). Dann ist Fimbrin, eine Untereinheit, bestehend aus fadenartigen Fimbrien auf der Zelloberfläche, eingesetzt worden, um exogene Peptide zu exprimieren, jedoch sind nur kleine Peptide erfolgreich produziert worden (Hedegaard et al., *Gene*, 85: 115–124, 1989).

[0013] Obwohl die Oberflächenproteine von Gram-negativen Bakterien auch schon verwendet worden sind, um Oberflächenexpression durchzuführen, sind kürzlich auch die Oberflächenproteine von Gram-positiven Bakterien zur Oberflächenexpression verwendet worden (Samuelson et al., *J. Bacteriol.*, 177: 1470–1476, 1995). Jedoch werden sogar in diesem Fall ein Sekretionssignal zum Durchtritt durch die innere Zellmembran und Träger zur Oberflächenexpression und zur Anheftung auf der Zellmembran benötigt. In der Tat sind das Sekretionssignal der Lipase, abgeleitet von *Staphylococcus hyicus*, und der Membran-Anhaftungsträger ("membrane attachment carrier") von Protein A, abgeleitet von *Staphylococcus aureus*, eingesetzt worden, um ein Malaria-Blutstadium-Antigen ("malaria blood stage antigen"), bestehend aus 80 Aminosäuren, und Albumin-Anheftungsprotein, abgeleitet von *Streptococcus*-Protein G, zu produzieren und die resultierenden Proteine effizient auf der Zelloberfläche zu exprimieren.

[0014] Da sich viele Untersuchungen, wie es oben beschrieben ist, bereits stark auf Oberflächenexpression mit Gram-negativen Bakterien und Gram-positiven Bakterien konzentriert haben, ist bereits eine Anzahl von Expressionssystemen zur Produktion wertvoller Proteine entwickelt und für Patentanmeldungen eingereicht worden, insbesondere in den USA, Europa und Japan. Im Detail haben 5 Patentfälle die Verwendung von Proteinen der äußeren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien offenbart (WO 9504069, WO 9324636, WO 9310214, EP 603672, US 5356797), eine Patentanmeldung berichtete über die Verwendung von Pili als einem Zelloberflächen-Organell (WO 9410330), und ein Fall verwendet ein Zelloberflächen-Lipoprotein (WO 9504079).

[0015] Wie es oben dargelegt ist, müssen zum Exprimieren exogener Proteine auf einer Zelloberfläche unter Verwendung eines Proteins der äußeren Zellmembran das geeignete Protein der inneren Zellmembran und das exogene Protein auf einem Genlevel verknüpft sein, zur Biosynthese angeregt und auf der äußeren Zellmembran, nachdem sie die innere Zellmembran stabil passiert haben, beibehalten werden. Um dieses Verfahren zu bewerkstelligen, sollte eine innere Zellmembran, die die folgenden Erfordernisse befriedigt, ausgewählt werden, dann auf den Träger zur Oberflächenexpression angewandt werden: Vor allem das Vorhandensein eines Sekretionssignals zum Durchtritt durch die innere Zellmembran, zweitens das Vorhandensein eines Targetierungssignals zur stabilen Anheftung an der äußeren Zellmembran, drittens massive Expression auf der Zelloberfläche und viertens stabile Expression des Proteins, ungeachtet seiner Größe.

[0016] Jedoch sind Träger zur Oberflächenexpression, die alle diese Erfordernisse erfüllen, noch nicht entwickelt worden. Gegenwärtig ist nur den folgenden Nachteilen abgeholfen worden.

[0017] Auf der Basis eines solchen Hintergrunds untersuchten die Erfinder der vorliegenden Erfindung die Anwendung eines Poly- γ -glutamat-Synthase-Gens (pgsBCA), das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, als einen neuartigen Träger zur Oberflächenexpression. Als ein Ergebnis wurde ein neuartiger Expressionsdurchlass ("expression vent") oder ein neuartiges pgsBCA-enthaltendes Gen, das exogene Proteine effizient auf mikrobiellen Oberflächen produzieren kann, zusammen mit einem Verfahren zum erfolgreichen Exprimieren exogener Proteine auf mikrobiellen Oberflächen in einem großen Maßstab, entwickelt.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0018] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum Produzieren exogener "Ziel"-Proteine auf einer mikrobiellen Zelloberfläche bereitzustellen.

[0019] Genauer gesagt, wurde in der vorliegenden Erfindung ein neuer Oberflächenexpressionsträger, der Fremdproteine auf den Oberflächen von Gram-negativen und Gram-positiven Mikroben in einem großen Maßstab exprimieren kann, aus den Proteinen der äußeren Zellmembran, die an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt sind, aus einem *Bacillus* sp.-Stamm ausgewählt. Dann wurde unter Verwendung dieses Gens ein Oberflächenexpressionsvektor, der exogene "Ziel"-Proteine oder Peptide auf mikrobiellen Zelloberflächen exprimieren kann, konstruiert und in verschiedene Arten von Wirtszellen transformiert, um Zelltransformanten ("cell transformants") zur Oberflächenexpression zu sammeln.

[0020] Um die Ziele der vorliegenden Erfindung zu erreichen, wird ein Oberflächenexpressionsvektor vorgestellt, der ein oder mehrere Gene, die für einen Poly- γ -glutamat-Synthetase-Komplex kodieren, ausgewählt aus pgsB, pgsC und pgsA, enthält.

[0021] Genauer gesagt, stellt die vorliegende Erfindung einen Expressionsvektor zur Produktion eines Zielproteins auf einer mikrobiellen Zelloberfläche, der ein oder mehr als zwei Gene, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus pgsB, pgSC und pgsA, das bzw. die für einen Poly- γ -glutamat-Synthetase-Komplex kodiert (kodieren), und ein Gen, das für ein Zielprotein kodiert, enthält, vor. Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung einen Oberflächenexpressionsvektor zum Produzieren eines Zielproteins auf einer mikrobiellen Zelloberfläche vor, worin die pgsB-, pgSC- und pgsA-Gene Nucleotidsequenzen enthalten, die 80% homolog zu jenen in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 bzw. SEQ ID NO: 3 sind.

[0022] Weiterhin wird eine Zelltransformante vorgestellt, die unter Verwendung der oben genannten Expressionsvektoren transformiert ist.

[0023] Schließlich stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Exprimieren eines Zielproteins auf einer mikrobiellen Zelloberfläche von Gram-negativen oder Gram-positiven Wirtszellen bereit, wobei das Verfahren umfasst:

Kultivieren Gram-negativer oder Gram-positiver Bakterien, die mit den oben genannten Expressionsvektoren transformiert sind.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0024] Das oben genannte und andere Ziele, Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aufgrund der folgenden detaillierten Beschreibung besser verstanden werden, wenn diese in Verbindung mit den begleitenden Figuren betrachtet wird, wobei:

[0025] [Fig. 1](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pGNBCA und des rekombinanten Expressionsvektors pGNBCA-HB168, die Gram-negative Bakterien als die Wirtszelle in der vorliegenden Erfindung verwenden, darstellt.

[0026] [Fig. 2](#) die Oberflächenexpression des Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigenproteins in einem Gram-negativen Bakterium, das mit dem rekombinanten Expressionsvektor pGNBCA-HB168 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, auf der Basis des Durchföhrens von Western-Blotting und fluoreszenzaktivierten Zellsortierungs-Assays ("fluorescence-activated cell sorting assays") darstellt.

[0027] [Fig. 3](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pGNCA und des rekombinanten Expressionsvektors pGNCA-HB168 der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0028] [Fig. 4](#) die Oberflächenexpression des Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigenproteins in einem Gram-negativen Bakterium, das mit den rekombinanten Oberflächenexpressionsvektoren pGNCA-HB168:A2, pGNA-HB168:A3 und pGNHB-A:A4 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, auf der Basis der Durchführung von Western-Blotting und fluoreszenzaktivierten Zellsortierungs-Assays darstellt.

[0029] [Fig. 5](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pGNA und des rekombinanten Expressionsvektors pGNA-HB168 der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0030] [Fig. 6](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pGNCA2 und des rekombinanten Expressionsvektors pGNHB-A der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0031] [Fig. 7](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pGNC und des rekombinanten Expressionsvektors pGNC-PreS1 der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0032] [Fig. 8](#) das Oberflächenexpressionsmuster des Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigenproteins PreS1 in einem Gram-negativen Bakterium, das unter Verwendung des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pGNC-PreS1 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, auf der Basis der Durchführung eines Western-Blotting-Assays darstellt.

[0033] [Fig. 9](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:BCA und des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:BCA-HB168 der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0034] [Fig. 10](#) das Oberflächenexpressionsmuster der Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigendeterminante in einem Gram-negativen Bakterium, das unter Verwendung des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:BCA-HB168 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, auf der Basis der Durchführung von Western-Blotting und fluoreszenzaktivierten Zellsortierungs-Assays darstellt.

[0035] [Fig. 11](#) die Lebendimpfstoff-Wirksamkeit eines Gram-negativen Bakteriums, das unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:BCA-HB168 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, darstellt.

[0036] [Fig. 12](#) die Oberflächenexpression der Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigendeterminante in einem Gram-positiven Bakterium, das unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:BCA-HB168 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, auf der Basis der Durchführung von Western-Blotting und fluoreszenzaktivierten Zellsortierungs-Assays darstellt.

[0037] [Fig. 13](#) die Lebendimpfstoff-Wirksamkeit eines Gram-positiven Bakteriums, das unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:BCA-HB168 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, darstellt.

[0038] [Fig. 14](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A und der rekombinanten Expressionsvektoren pHCE1LB:A-TGEN1 und pHCE1LB:A-PEDN der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0039] [Fig. 15](#) das Oberflächenexpressionsmuster des TGE-Virusproteins N, hergestellt von Gram-negativen (*Escherichia coli*) und Gram-positiven Bakterien, die unter Verwendung des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-TGEN1 der vorliegenden Erfindung transformiert wurden, auf der Basis der Durchführung eines Western-Blotting-Assays darstellt.

[0040] [Fig. 16](#) das Oberflächenexpressionsmuster des PED-Virusproteins N, hergestellt von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, die unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-PEDN der vorliegenden Erfindung transformiert wurden, auf der Basis der Durchführung eines Western-Blotting-Assays darstellt.

[0041] [Fig. 17](#) die Lebendimpfstoff-Wirksamkeit eines Gram-positiven Bakteriums, das unter Verwendung der rekombinanten Expressionsvektoren pHCE1LB:A-TGEN1 und pHCE1LB:A-PEDN der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, darstellt.

[0042] [Fig. 18](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A und der rekombinanten Expressionsvektoren pHCE1LB:A-PreS1 und pHCE1LB:A-PreS2 der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0043] [Fig. 19](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A und der rekombinanten Expressionsvektoren pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 und pHCE1LB:A-L der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0044] [Fig. 20](#) das Oberflächenexpressionsmuster von Hepatitis B-Virus-PreS1 und -PreS1:PreS2, produziert von einem Gram-negativen Bakterium, das unter Verwendung der rekombinanten Expressionsvektoren pHCE1LB:A-PreS1 bzw. pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 der vorliegenden Erfindung transformiert wurde und das Oberflächenexpressionsmuster des Hepatitis B-Virusproteins L, hergestellt von einem Gram-negativen Bakterium, das unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-L der vorliegenden Erfindung transformiert wurde, auf der Basis der Durchführung eines Western-Blotting-Assays darstellt.

[0045] [Fig. 21](#) die Restriktionskarten des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-TNF- α der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0046] [Fig. 22](#) die Restriktionskarten des rekombinanten Expressionsvektors pGNA-Lipase der vorliegenden Erfindung und Lipase-Aktivität, die auf der Zelloberfläche eines Gram-negativen Bakteriums, das unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pGNA-Lipase transformiert wurde, darstellt.

[0047] [Fig. 23](#) die Restriktionskarten des rekombinanten Expressionsvektors pGNA-Amidase der vorliegenden Erfindung und Amidase-Aktivität, die auf der Zelloberfläche eines Gram-negativen Bakteriums, das unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pGNA-Amidase transformiert wurde, exprimiert wurde, darstellt.

[0048] Im Nachstehenden wird die vorliegende Erfindung deutlicher beschrieben.

[0049] Das Protein, das vom pgsBCA-Gen kodiert wird, ist ein äußeres Zellprotein ("cell outer protein"), das in *Bacillus* sp.-Stämmen vorhanden ist, und seine Polymersubstanz ist essbar, löslich, anionisch, biologisch abbaubar, wobei es an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist und von *Bacillus subtilis* (IFO3336; Natto. Biochem. Biophys. Research Comm., 263, 6–12, 1999), *Bacillus licheniformis* (ATCC 9945; Biotech. Bioeng., 4, 430–437, 1998) und *Bacillus anthracis* (J. Bacteriol., 171, 722–730, 1989) etc. produziert wird.

[0050] Aus dem Natto-Stamm (*Bacillus subtilis* IFO3336) wurde ein Zellmembranprotein (pgsBCA) abgetrennt, das aus einer Gesamtzahl von 922 Aminosäuren, genauer, 393 Aminosäuren, in pgsB, 149 Aminosäuren in pgsC und 380 Aminosäuren in pgsA, zusammengesetzt war. Ashiuchi et al. berichteten über die Klonierung des vom *Bacillus natto*-Stamm abgeleiteten Poly- γ -glutamat-Synthetase-Gens, seine Transformation in *Escherichia coli* und seine Synthese (Ashiuchi et al., Biochem. Biophys. Research Comm, 263: 6–12, 1999).

[0051] Trotzdem sind die Funktionen des pgsBCA-Proteins, das den Poly- γ -Glutamat-Synthetase-Komplex umfasst, noch nicht im Detail aufgeklärt worden. Unter den Proteinen, die den Enzymkomplex bilden, ist wenigstens pgsB ein Amidligase-System und interagiert mit der Zellmembran oder der Zellwand an einer spezifischen Aminosäure im Endterminus von pgsB. pgsA hat eine hydrophile Aminosäuresequenz, die für den N-Terminus spezifisch ist und einen C-Terminus, der anscheinend als ein Sekretionssignal, Targetierungssignal und Anheftungssignal in Verbindung mit pgsB zum Durchtritt durch die innere Zellmembran funktioniert.

[0052] Die gegenwärtigen Erfinder haben aufgezeigt, dass das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, vorteilhaft ist als ein Oberflächenexpressions-Träger und exogene Proteine auf einer Zelloberfläche auf der Basis der Struktur und der Eigenschaften seiner primären Aminosäuresequenz exprimieren kann. Es gibt konkret verschiedene Vorteile. Erstens kann das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, in großem Maßstab zur Synthese von Poly- γ -glutamat und zur extrazellulären Sekretion exprimiert werden; zweitens kann das Protein der äußeren Zellmembran, das auf der Zelloberfläche exprimiert wird, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, während der restlichen Zeitdauer des Zellzyklus stabil erhalten werden; drittens wird das Protein der äußeren Zellmembran strukturell auf der Zelloberfläche hinausgestreckt bzw. hervorgeschnitten, insbesondere im Fall von pgsA; viertens stammt das Protein der äußeren Zellmembran (pgsBCA), das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, von der Zelloberfläche eines Gram-positiven Bakteriums und kann auf der Zelloberfläche von entweder einem Gram-positiven oder einem Gram-negativen Bakterium exprimiert werden.

[0053] Die vorliegende Erfindung stellt rekombinante Expressionsvektoren, die zur Expression exogener Proteine auf einer Zelloberfläche durch Ausnutzen der Eigenschaft der äußeren Zellmembran, an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt zu sein, verwendbar sind, bereit. Genauer gesagt, sind die Oberflächenexpressionsvektoren der vorliegenden Erfindung so entworfen, dass sie ein Sekretionssignal und ein Targetierungssignal in der Primärsequenz des Proteins der äußeren Zellmembran (pgsBCA), das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, enthalten.

[0054] Weiterhin stellt die Erfindung ein Verfahren zum Exprimieren exogener Proteine auf der mikrobiellen Oberfläche von sowohl Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien bereit, wobei der Oberflächenexpressionsvektor verwendet wird, der auf der Ausnutzung der Merkmale des Proteins der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, basiert. Genauer gesagt, kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Herstellen exogener Proteine bestimmte Verfahren, z.B. Ultraschallbehandlung von Zellen oder Proteinaufreinigung, weglassen, da exogene Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wobei das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, verwendet wird.

[0055] Deshalb stellt die vorliegende Erfindung verschiedene Verwendungen für exogene Proteine, die durch das Oberflächenexpressionsverfahren hergestellt werden, bereit. Genauer gesagt, ist das vorgeschlagene Verfahren wirksam zum Produzieren von Antigenen und Antikörpern, Peptidbibliotheken zum Durchmustern auf Antigene, Anheftungsproteine oder Adsorptionsproteine und physiologisch aktiven Substanzen etc.

[0056] Zusätzlich zum Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, können alle Arten von Oberflächenexpressionsvektoren, die Gene zur Synthese von Poly- γ -glutamat umfassen, in den Rahmen der vorliegenden Erfindung eingeschlossen werden.

[0057] Darüber hinaus können die Oberflächenexpressionsvektoren, die das Poly- γ -glutamat-Synthetase-Gen in der vorliegenden Erfindung verwenden, auf alle Arten mikrobieller Stämme zur Oberflächenexpression angewandt werden. Diese Vektoren können bevorzugt für Gram-negative Bakterien, insbesondere *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera*, *Mycobacterium bovis* und *Shigella*, und für Gram-positive Bakterien, insbesondere *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Lysteria*, *Monoxytogenesis* und *Streptococcus*, eingesetzt werden. Alle Verfahren, die verwendet werden, um exogene Proteine unter Verwendung dieser Stämme herzustellen, können in den Rahmen der vorliegenden Erfindung eingeschlossen werden.

[0058] Abhängig von den Erfordernissen kann das Poly- γ -glutamat-Synthetase-Gen verändert bzw. manipuliert werden, um verschiedene Erkennungsstellen für alle oder bestimmte Restriktionsenzyme am N-Terminus oder C-Terminus zu inserieren. Deshalb sind Oberflächenexpressionsvektoren, die diese Restriktionsenzym-Erkennungsstellen umfassen, auch innerhalb des Rahmens der vorliegenden Erfindung.

[0059] Genauer gesagt, deckt die vorliegende Erfindung alle Poly- γ -glutamat-Synthetase-Gene, die von *Bacillus* sp.-Stämmen abgeleitet sind, ab. Unter diesen wird das pgsA-Gen verwendet, um die Restriktionsenzym-Erkennungsstelle am C-Terminus zu inserieren und verschiedene Arten exogener Proteine leicht zu klonieren, wodurch der Oberflächenexpressionsvektor pGNBCA konstruiert wird.

[0060] Die vorliegende Erfindung stellt auch den rekombinanten Oberflächenexpressionsvektor pGNBCA-HB168 vor, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen ein S-Antigen bildet, in einer fusionierten Form auf der Zelloberfläche eines Gram-negativen Bakteriums exprimieren kann. Genauer gesagt, ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus pgsB-, pgsC- und pgsA-Proteinen zusammengesetzt, dann wird der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem N-Terminus einer Antigendeterminante ligiert, wodurch ein neutralisierender Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen gebildet wird.

[0061] Die vorliegende Erfindung stellt auch die rekombinanten Oberflächenexpressionsvektoren pGNC-HB168, pGNA-HB168 und pGNHB-A vor, die eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen ein S-Antigen bilden kann, in einer fusionierten Form auf der Zelloberfläche eines Gram-negativen Bakteriums exprimieren können. Genauer ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran ("cell outer membrane protein complex"), der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, entweder aus pgsC- und pgsA-Proteinen oder nur aus pgsA-Proteinen zusammengesetzt, im ersten Fall wird dann der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens oder, im letzten Fall, der N-Terminus oder C-Terminus mit dem N-Terminus einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, ligiert.

[0062] Die vorliegende Erfindung stellt auch den rekombinanten Oberflächenexpressionsvektor pGNC-PreS1 vor, der eine Antigendeterminante exprimieren kann, die einen neutralisierenden Antikörper gegen ein S-Antigen in einer fusionierten Form auf der Zelloberfläche eines Gram-negativen Bakteriums bildet. Genauer gesagt, ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus pgsC-Protein zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsC-Protein-Gens mit dem N-Terminus des PreS1-Antigens aus den Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigenen ligiert.

[0063] Die vorliegende Erfindung stellt auch die rekombinanten Oberflächenexpressionsvektoren pHCE1LB:BCA und pHCE1LB:A vor, die den Oberflächenexpressionsvektor pGNBCA für ein Gram-negatives Bakterium modifizieren und sowohl auf Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien angewandt werden können. Genauer gesagt ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, entweder aus pgsB-, pgsC- und pgsA-Proteinen oder nur aus pgsA-Proteinen zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem exogenen Protein-Gen ligiert.

[0064] Die vorliegende Erfindung stellt auch den rekombinanten Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 vor, der sowohl auf Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien angewandt werden kann und eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen ein S-Antigen bildet, in einer fusionierten Form auf einer Zelloberfläche exprimiert. Genauer ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus den pgsB-, pgsC- und pgsA-Proteinen zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem N-Terminus einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, ligiert.

[0065] Die vorliegende Erfindung stellt auch den rekombinanten Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A-TGEN1 vor bzw. bereit, der sowohl auf Gram-negative als auch auf Gram-positive Bakterien an-

gewendet werden kann und Nucleoprotein bzw. Kernprotein N-Protein auf einer Zelloberfläche in einer fusionierten Form exprimiert. Genauer ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus pgsA-Proteinen zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem N-Terminus des partiellen Nucleoprotein-Gens des porzine transmissible Gastroenteritis (TGE)-Virus ligiert.

[0066] Die vorliegende Erfindung stellt auch den rekombinanten Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A-PEDN vor bzw. bereit, der sowohl auf Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien angewandt werden kann und ein Nucleoprotein N-Protein in einer fusionierten Form auf einer Zelloberfläche exprimiert. Genauer ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus pgsA-Proteinen zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem N-Terminus des Nucleoprotein-Gens des porzine Diarrhoe-Erkrankung (PED)-Virus ("porcine diarrhea disease (PED) virus") ligiert.

[0067] Die vorliegende Erfindung stellt auch die rekombinanten Oberflächenexpressionsvektoren pHCE1LB:A-PreS1, pHCE1LB:A-PreS2, pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 und pHCE1LB:A-L vor bzw. bereit, die sowohl auf Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien zur Oberflächenexpression von exPreS1, PreS2, PreS1-PreS2 bzw. gesamtem L-Protein unter den Hepatitis B-Virus-Oberflächen-L (PreS1-PreS2-S)-Proteinen in einer fusionierten Form auf einer Zelloberfläche angewandt werden können. Genauer ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus pgsA-Proteinen zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem N-Terminus von PreS1, PreS2, PreS1-PreS2 bzw. dem gesamten L-Protein ligiert.

[0068] Die vorliegende Erfindung stellt auch den rekombinanten Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A-TNF- α vor bzw. bereit, der sowohl auf Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien angewandt werden kann und das TNF- α -Protein in einer fusionierten Form auf einer Zelloberfläche exprimiert. Genauer ist das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus pgsA-Protein zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem N-Terminus des Tumornekrosefaktors α , ein Cytokin, ligiert.

[0069] Die vorliegende Erfindung stellt auch die rekombinanten Oberflächenexpressionsvektoren pGNA-Lipase und pGNA-Amidase, die auf Gram-negative Bakterien angewandt werden können und industrielle Enzyme, z.B. Lipase und Amidase, in einer fusionierten Form auf einer Zelloberfläche exprimieren, vor bzw. bereit. Genauer ist der Proteinkomplex der äußeren Zellmembran, der an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, aus pgsA-Proteinen zusammengesetzt, dann ist der C-Terminus des pgsA-Protein-Gens mit dem N-Terminus einer Lipase oder Amidase unter Enzymen zur industriellen Verwendung verknüpft.

BEISPIELE

[0070] Praktische und gegenwärtig bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden in den folgenden Beispielen erläutert.

<Beispiel 1> Konstruktion des Oberflächenexpressionsvektors pGNBCA

[0071] Um den Oberflächenexpressionsvektor der vorliegenden Erfindung herzustellen, der das pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran ("cell outer membrane protein gene pgsBCA"), das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und der ein Gram-negatives Bakterium als Wirtszelle verwendet, wurde die gesamte chromosomale DNA von *Bacillus subtilis* var. chungkookjang (Eingangsnummer: KCTC 0697 BP) gereinigt.

[0072] Das pgsBCA-Gen ist zusammengesetzt aus pgaB als ein DNA-Fragment, das die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 1 enthält, pgaC als ein DNA-Fragment, das die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 2 enthält und pgaA als ein DNA-Fragment, das die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 3 enthält, und hat die obenstehenden konsekutiven bzw. aufeinanderfolgenden Nucleotidsequenzen.

[0073] Um die Gene zu erhalten, die für den N-Terminus und den C-Terminus der inneren Zellmembran kodieren, die an der Biosynthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, wurde das gesamte Chromosom als die Matrize ausgewählt, und Oligonucleotide mit der Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 4 (5-gaa caa tgg gct ggt tac tcc tta tag cct g-3) am N-Terminus und der Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 5 (5-ctc gga tcc ttt aga ttt tag ttt gtc act-3) am C-Terminus wurden als die Primer verwendet. Dann wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR)

unter Verwendung der Matrize und der Primer durchgeführt.

[0074] Der Oligonucleotid-Primer von SEQ ID NO: 4, der dem N-Terminus entspricht, wurde auch so konstruiert, dass er die Erkennungsstelle des Restriktionsenzyms Ncol enthält, die im Expressionsvektor pHCE19T(II) vorhanden ist, wohingegen der Oligonucleotid-Primer von SEQ ID NO: 5, der dem C-Terminus entspricht, so konstruiert wurde, dass er die Erkennungsstelle des Restriktionsenzyms BamHI, die im Expressionsvektor pHCE19T(II) vorhanden ist, enthält. An diesem Punkt wurde gemessen, dass das amplifizierte Genfragment eine Größe von 2,8 kb hat, was von der N-terminalen Region des pgsB-Gens des Proteins der äußeren Zellmembran bis zur C-terminalen Region von pgsA reicht. Das durch die PCR amplifizierte Genfragment wurde mit den Restriktionsenzymen Ncol und BamHI verdaut und in den mit Ncol und BamHI verdauten, konstitutiv hohen bzw. hoch exprimierenden Expressionsvektor pHCE19T(II) inseriert. Als ein Ergebnis davon umfasste der neue Expressionsvektor, der das Gen für das Protein der inneren Zellmembran enthält, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, kein Translations-Terminations-Kodon, enthielt eine neue zusätzliche Restriktionsenzym-Erkennungsstelle, war etwa 6,5 kb groß, hatte die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 6 und wurde Expressionsvektor pGNBCA genannt (siehe [Fig. 1](#)).

[0075] Der Oberflächenexpressionsvektor wurde in Escherichia coli transformiert, und die resultierende Zelltransformante bei der International Deposit Organization and Korean Collection for Type Cultures (KCTC: 52 Eoeun-dong, Yusong-gu, Daejon) beim Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) am 26. Juli 2001 (Eingangsnummer: KCTC 10025 BP) hinterlegt.

<Beispiel 2> Konstruktion des Oberflächenexpressionsvektors pGNBCA-HB168

[0076] Der rekombinante Expressionsvektor pGNBCA-HB168, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

[0077] Zum Inserieren des Hepatitis B-Virus-S-Antigen-Gens in den Oberflächenexpressionsvektor pGNBCA, der ein Gram-negatives Bakterium als Wirtszelle verwendet, wurde das Hepatitis B-Virus-Gen, etwa 1,4 kb groß, enthalten im allgemeinen Klonierungsvektor pUC8, als die Matrize ausgewählt, und Oligonucleotide mit der Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 7 und der Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 8 wurden als die Primer eingesetzt. Dann wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Matrize und der Primer durchgeführt, um das S-Antigen-Gen zu amplifizieren. Als Ergebnis wurde ein 168 bp großes amplifiziertes Genfragment erhalten. An diesem Punkt wurden die Primer mit der Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 7 und der Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 8 auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII enthielten. Dann wurde das amplifizierte S-Antigen-Gen des Hepatitis B-Virus mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und in die bereits vorbereitete C-terminale Region des Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, ligiert, wobei die Translationskodons angepasst wurden. Der resultierende rekombinante Expressionsvektor pGNBCA-HB168 ist in [Fig. 1](#) dargestellt.

<Beispiel 3> Oberflächenexpression der Antigendeterminante, die neutralisierende Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, wobei der rekombinante Expressionsvektor pGNBCA-HB168 verwendet wird

[0078] Die Oberflächenexpression einer Antigendeterminante, die neutralisierende Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, wurde unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pGNBCA-HB168 untersucht.

[0079] Der in Beispiel 2 konstruierte Expressionsvektor wurde in *E. coli* transformiert und in einem 500 ml-Kolben kultiviert, der 50 ml eines LB-Mediums (5 g/l Hefeeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l Natriumchlorid, pH 7,0) und 100 mg/l des Antibiotikums Ampicillin zum Induzieren der Oberflächenexpression enthielt.

[0080] Die bakterielle Expression der Antigendeterminante, die Antikörper gegen das S-Antigen, fusioniert mit dem C-terminalen Gen, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, bildet, wurde durch Ausführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunblotting mit Antikörpern gegen das S-Antigen identifiziert bzw. bestätigt. Im Wesentlichen wurden die Proteine, die bei der gleichen Zellkonzentration erhalten wurden, denaturiert, so dass experimentelle Proben hergestellt und dann durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht werden konnten, so dass die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran trans-

feriert wurden. Die resultierende PVDF-Membran wurde dann in einem Blockierungspuffer (10 ml Tris HCl, 5% Magermilch, pH 8,0) für eine Stunde bewegt, blockiert, und dann für 12 Stunden mit einem von der Ziege stammenden polyklonalen primären Antikörper gegen das S-Antigen, der mit dem Blockierungspuffer 1.000-fach verdünnt war, umgesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die resultierende Membran mit der gleichen Pufferlösung gewaschen und 4 Stunden lang mit einem sekundären Antikörper, der mit Biotinen konjugiert und mit dem Blockierungspuffer 1.000-fach verdünnt war, umgesetzt. Die umgesetzte Membran wurde wieder mit dem Puffer gewaschen und für eine Stunde in ein Avidin-Biotin-Reagens eingetaucht und gewaschen. Die untergetauchte Membran wurde durch Zugeben von Substraten und H₂O₂ und DAB-Reagentien als Farbstoffe gefärbt, was eine spezifische Bindung mit den Antikörpern gegen das S-Antigen und obenstehende Fusionsproteine identifizierte bzw. bestätigte (siehe [Fig. 2](#), A). In [Fig. 2](#) ist Bahn 1 die untransformierte Wirtszelle JM109, während Bahn 2 die Zelltransformante pGNBCA-HB168/JM109 ist. Wie es dargestellt ist, wurde durch den Expressionsvektor pGNBCA-HB168 eine Fusionsprotein-Bande von etwa 48 kDa produziert.

[0081] Um die Expression einer Antigendeterminante, die neutralisierende Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet und die auf der E. coli-Oberfläche lokalisiert ist, direkt zu bestätigen, wurde die die Oberflächenexpression induzierende E. coli-Transformante Ultraschallbehandelt und auf der Basis einer Fraktionierung der äußeren Membran in die lösliche Fraktion, die innere Zellmembran-Fraktion und die äußere Zellmembran-Fraktion aufgetrennt, dann durch Bewerkstelligung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunblotting der Antikörper gegen das S-Antigen untersucht. Im Wesentlichen wurde die E. coli-Transformante, die zum Induzieren der Expression des Fusionsproteins auf der Zelloberfläche verwendet wurde, wie es oben beschrieben ist, und nicht transformierte E. coli geerntet, auf die gleiche Konzentration eingestellt und mehrfach unter Verwendung einer Pufferlösung (10 mM Hepes, pH 7,4) gewaschen. Danach wurde das Endprodukt ("resultant") in einem Puffer, enthaltend 10 g/ml Lysozym, 1 mM PMSF und 1 mM EDTA, flotiert, für 10 Minuten bei 4°C umgesetzt, DNase (0,5 mg/ml) und RNase (0,5 mg/ml) wurden zugegeben, das Gemisch wurde mit einer Ultraschallsonde ("sonicator") aufgebrochen und die intakten E. coli und Zell-Debris wurden bei 4°C für 20 Minuten unter Anwendung von Zentrifugation mit 10.000 × g abgetrennt. Der abgetrennte Zell-Debris von E. coli wurde dann bei 4°C für 20 Minuten bei 15.000 × g zentrifugiert, und die Protein-haltigen Fraktionen von Periplasma und Cytoplasma wurden gesammelt. Das resultierende Zellpellet wurde in einen PBS-Puffer (pH 7,4), der 1% Sarcosyl (N-Laurylsarcosinat-Natriumsalz) enthielt, eingetaucht und bei 4°C für 2 Stunden bei 15.000 × g zentrifugiert und abgetrennt. An diesem Punkt wurde der Überstand in die innere Membran von E. coli und das Zellpellet des Proteins der äußeren Membran von E. coli fraktioniert, dann auf der Basis der Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das S-Antigen untersucht. Unter den obenstehenden E. coli-Fraktionen wurde eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, auf der äußeren Zellmembran identifiziert (siehe [Fig. 2](#); A: das Ergebnis der E. coli-Membran-Fraktion nach Western-Blotting). Wie in [Fig. 2](#) dargestellt, ist Bahn 1 der nicht-transformierte E. coli-Stamm JM109, Bahn 2 ist die ganze Zelle der E. coli-Transformante pGNBCA-HB168/JM109, Bahn 3 ist die lösliche Fraktion der E. coli-Transformante pGNBCA-HB168/JM109, Bahn 4 ist die innere Zellmembranfraktion der E. coli-Transformante pGNBCA-HB168/JM109 und Bahn 5 ist die äußere Zellmembranfraktion der E. coli-Transformante pGNBCA-HB168/JM109.

[0082] Durch Durchführen von fluoreszenzaktivierter Zellsortierungs (FACS)-Durchflusszytometrie wurde verifiziert, dass eine antigene Determinante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen S-Antigen bildet, auf der E. coli-Zelloberfläche vom C-Terminus des Poly-γ-glutamat-Synthetase-Proteins exprimiert worden war. Zur Immunfluoreszenzfärbung wurde der E. coli, der verwendet worden war, um die Oberflächenexpression zu induzieren, bei der gleichen Zellkonzentration geerntet und mehrfach unter Verwendung eines PBS-Puffers (pH 7,4) gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde dann unter Verwendung von 1 ml eines Puffers, der 1% Rinderserumalbumin enthielt, suspendiert und mit von der Ziege stammenden polyklonalen primären Antikörpern gegen das S-Antigen, die 1.000-fach verdünnt waren, bei 4°C 12 Stunden lang umgesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Zellen wieder mehrfach gewaschen, unter Verwendung von 1 ml eines Puffers, der 1% Rinderserumalbumin enthielt, suspendiert, dann bei 4°C 3 Stunden lang mit Biotin-assoziierten sekundären Antikörpern gegen das S-Antigen, die 1.000-fach verdünnt waren, umgesetzt. Auch die vollständig umgesetzten Zellen wurden mehrfach unter Verwendung einer Pufferlösung gewaschen, mit 0,1 ml eines Puffers, der 1% Rinderserumalbumin enthielt, suspendiert, dann mit dem 1.000-fach verdünnten Streptoavidin-R-Phycoerythrin-Farbreagens, welches spezifisch für Biotine ist, gebunden.

[0083] Danach wurden die E. coli-Zellen mehrfach wieder gewaschen und durch Durchführung von fluoreszenzaktivierter Zellsortierungs-Durchflusszytometrie untersucht. Als ein Ergebnis wurde bestätigt, dass ein Antigendeterminante-Protein, das einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, im Gegensatz zu dem nicht-transformierten E. coli, auf der Zelloberfläche exprimiert worden war (siehe [Fig. 2](#), B). Wie es in

Fig. 2 dargestellt ist, stellt die weiße Bande den nicht-transformierten *E. coli*-Stamm JM109 dar, während die schwarze Bande von der *E. coli*-Transformante pGNBCA-HB168/JM109 abgeleitet ist. Folglich wurde von dem nicht-transformierten *E. coli*-Stamm kein Antigendeterminante-Protein, das einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, exprimiert, was jedoch offensichtlich bei der mit dem Oberflächenexpressionsvektor der vorliegenden Erfindung transformierten *E. coli*-Transformante festgestellt wurde.

<Beispiel 4> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pGNCA-HB101 und Oberflächenexpression einer Antigendeterminante, die neutralisierende Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet

(1) Ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Antigendeterminante exprimieren kann, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, wurde unter Verwendung des pgsBCA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

Das pgsCA-Gen hat eine konsekutive Nucleotidsequenz, die die pgsC-DNA von SEQ ID NO: 2 und die pgAA-DNA von SEQ ID NO: 3 enthält.

Um die N-terminalen und C-terminalen Gene, die für die pgsC- und pgsA-Proteine kodieren, aus dem Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, zu erhalten, wurde das gesamte Chromosom als die Matrize und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 8 am N-Terminus und von SEQ ID NO: 5 am C-Terminus enthalten, als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt.

Der Primer, der dem N-Terminus entspricht und die Sequenz von SEQ ID NO: 9 enthält, wurde auch so konstruiert, dass er die Erkennungsstelle des Restriktionsenzyms NdeI umfasst. An diesem Punkt umfasste die amplifizierte Genregion etwa 1,6 kb von der N-terminalen Region des pgsC-Gens für das Protein der äußeren Membran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, bis zur C-terminalen Region von pgsA. Die durch die Polymerasekettenreaktion amplifizierten Gene wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI verdaut und in dem schon mit BamHI und NdeI verdauten konstitutiv hoch exprimierenden Expressionsvektor pHCE19T(II) inseriert, wodurch ein neuer Expressionsvektor, etwa 5,3 kb groß, mit neuen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen und ohne Terminationskodon bzw. Stoppkodon am Ende des Gens für das Protein der äußeren Zellmembran geschaffen wurde, der Expressionsvektor pGNCA genannt wurde (siehe **Fig. 3**).

(2) Der rekombinante Expressionsvektor pGNCA-HB168, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen exprimieren kann, wurde durch dasselbe Verfahren, wie es oben in Beispiel 2 beschrieben ist, konstruiert. Genauer gesagt, wurde der rekombinante Expressionsvektor durch Ausnutzung der pgsC- und pgsA-Gene der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Gen, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle hergestellt.

Der obenstehend konstruierte rekombinante Expressionsvektor pGNCA-HB168 ist in **Fig. 3** dargestellt.

(3) Die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, unter Verwendung des Oberflächenexpressionsvektors pGNCA-HB168 wurde wie folgt untersucht:

Der Oberflächenexpressionsvektor wurde in eine *E. coli*-Wirtszelle transformiert, und die Expression wurde unter Verwendung des gleichen Verfahrens, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde auf der Basis der Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das S-Antigen festgestellt, dass eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, fusioniert mit dem pgsCA-Protein der äußeren Zellmembran in der *E. coli*-Transformante exprimiert worden ist (siehe **Fig. 4**).

[0084] Wie in **Fig. 4** dargestellt, ist Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, während Bahn 2 die Zelltransformante pGNCA-HB168/JM109 ist. Als ein Ergebnis wurde das fusionierte Protein bzw. Fusionsprotein, das von dem rekombinanten Expressionsvektor pGNCA-HB168 exprimiert wurde, als eine Bande von etwa 48 kDa identifiziert.

<Beispiel 5> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pGNA-HB168 und Oberflächenexpression der Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet

(1) Ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, exprimieren kann, wurde unter Verwendung des

pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Gen, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

Das pgsA-Gen enthält die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 3.

Um die N-terminalen und C-terminalen Gene, die für das pgsA-Protein kodieren, aus dem Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, zu erhalten, wurde das gesamte Chromosom als die Matrize eingesetzt und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 10 am N-Terminus und SEQ ID NO: 5 am C-Terminus enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet.

Der Primer, der dem N-Terminus entspricht und die Sequenz von SEQ ID NO: 10 enthält, wurde auch so konstruiert, dass er die Erkennungsstelle des Restriktionsenzyms NdeI enthält. An diesem Punkt war der amplifizierte Gembereich etwa 1,1 kb von der N-terminalen Region des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Membran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, bis zur C-terminalen Region von pgsA.

Die durch die Polymerasekettenreaktion amplifizierten Gene wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI verdaut und in den schon mit BamHI und NdeI verdauten konstitutiv hoch exprimierenden Expressionsvektor pHCE19T(II) inseriert, wodurch ein neuer Expressionsvektor, etwa 4,8 kb groß, mit neuen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen und ohne Terminationskodon am Ende des Gens für das Protein der äußeren Zellmembran geschaffen wurde, der Expressionsvektor pGNA genannt wurde (siehe [Fig. 5](#)).

(2) Der rekombinante Expressionsvektor pGNA-HB168, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, exprimieren kann, wurde durch das gleiche Verfahren, wie es oben in Beispiel 2 beschrieben ist, konstruiert. Genauer gesagt, wurde der rekombinante Expressionsvektor durch Ausnutzung des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Gen, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle hergestellt.

Der obenstehend konstruierte rekombinante Expressionsvektor pGNA-HB168 ist in [Fig. 5](#) dargestellt.

(3) Die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, unter Verwendung des Oberflächenexpressionsvektors pGNA-HB168 wurde wie folgt untersucht:

Der Oberflächenexpressionsvektor wurde in die *E. coli*-Wirtszelle transformiert, und Expression wurde durch das gleiche Verfahren, wie es oben in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das S-Antigen festgestellt, dass eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, die mit dem pgsCA-Protein der äußeren Zellmembran fusioniert ist, in der *E. coli*-Transformante exprimiert worden war (siehe [Fig. 5](#)).

[0085] Wie in [Fig. 5](#) dargestellt, ist Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, während Bahn 2 die Zelltransformante pGNA-HB168/JM109 ist. Als ein Ergebnis wurde das fusionierte Protein bzw. Fusionsprotein, das von dem rekombinanten Expressionsvektor pGNA-HB168 exprimiert wurde, als eine Bande von etwa 48 kDa identifiziert.

[0086] Außerdem wurde die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen S-Antigen bildet, auf der *E. coli*-Zelloberfläche durch das pgsA-Protein in der äußeren Zellmembran auch auf der Basis der Durchführung von fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS)-Durchflusszytometrie verifiziert. Zu diesem Zweck wurde das gleiche Verfahren, wie es oben in Beispiel 3 beschrieben ist, verwendet, und eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, wurde auf der Zelloberfläche detektiert, was von den Ergebnissen für die nicht-transformierten *E. coli* verschieden ist (siehe [Fig. 4](#)). Wie in [Fig. 4](#) dargestellt, ist die weiße Bande der nicht-transformierten *E. coli* JM109, während die schwarze Bande von der *E. coli*-Transformante pGNA-HB168/JM109 abgeleitet ist. Als ein Ergebnis wiesen die nicht-transformierten *E. coli* keine Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, auf, wohingegen die *E. coli*-Transformante, die mit dem Oberflächenexpressionsvektor, der nur das pgsA-Gen enthält, transformiert ist, deutlich die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, auf der Zelloberfläche offenbarte.

<Beispiel 6> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pGNHB-A und Oberflächenexpression der Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet

(1) Ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, exprimieren kann, wurde unter Verwendung des N-ter-

minalen pgsA-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

Das pgsA-Gen enthält die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 3.

Um die N-terminalen und C-terminalen Gene, die für das pgsA-Protein aus dem Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, kodieren, zu erhalten, wurde das gesamte Chromosom als die Matrize eingesetzt, und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 11 am N-Terminus und SEQ ID NO: 12 am C-Terminus enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet.

Der Primer, der dem N-Terminus entspricht und die Sequenz von SEQ ID NO: 11 enthält, war auch so konstruiert, dass er die Erkennungsstelle des Restriktionsenzyms BamHI umfasst. An diesem Punkt war die amplifizierte Genregion etwa 1,1 kb von der N-terminalen Region des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Membran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, bis zur C-terminalen Region von pgsA. Die durch die Polymerasekettenreaktion amplifizierten Gene wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und in den schon mit BamHI und HindIII verdauten, konstitutiv hoch exprimierenden Expressionsvektor pHCE19T(II) inseriert, wodurch ein neuer, pGNA2 genannter Expressionsvektor, etwa 4,8 kb groß, mit neuen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen am Anfang des pgsA-Gens und ohne Terminationskodon am Ende des Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, geschaffen wurde (siehe [Fig. 6](#)).

(2) Der rekombinante Expressionsvektor pGNHB-A, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, exprimieren kann, wurde auch konstruiert. Genauer gesagt, wurde der rekombinante Expressionsvektor durch Ausnutzen der N-terminalen Sequenz des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Gen des Proteins, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle hergestellt.

Um das Hepatitis B-Virus-S-Antigen-Gen in den Oberflächenexpressionsvektor pGNA2 zu inserieren, wobei ein Gram-negatives Bakterium als die Wirtszelle genutzt wird, wurden etwa 1,4 kb des Hepatitis-Virus-Gens, kloniert im allgemeinen Klonierungsvektor pUC18, als die Matrize ausgewählt, und Oligonucleotide mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 14 wurden als die Primer zur Amplifikation des S-Antigen-Gens durch eine Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt war die amplifizierte Genregion 1,6 bp groß. Die Primer mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 14 wurden auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI, die im Oberflächenexpressionsvektor pGNA vorhanden sind, enthalten. Die amplifizierten Gene des Hepatitis B-Virus-S-Antigens wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI verdaut und mit der N-terminalen Region des pgsA-Gens aus den Genen der äußeren Zellmembran, die an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt sind, im Oberflächenexpressionsvektor pGNA2 ligiert, der bereits durch Anpassung der Translationskodons vorbereitet worden war. Der konstruierte rekombinante Expressionsvektor pGNHB-A ist in [Fig. 6](#) dargestellt.

(3) Die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, unter Verwendung des Oberflächenexpressionsvektors pGNHB-A wurde wie folgt untersucht:

Der Oberflächenexpressionsvektor wurde in die *E. coli*-Wirtszelle transformiert, und Expression wurde unter Verwendung des gleichen Verfahrens, das oben in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde die Identifizierung einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, fusioniert mit dem pgsCA-Protein der äußeren Zellmembran, die in der *E. coli*-Transformante exprimiert wurde, auf der Basis von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das S-Antigen durchgeführt (siehe [Fig. 5](#)).

[0087] Wie in [Fig. 5](#) dargestellt, ist Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, während Bahn 2 die Zelltransformante pGNHB-A/JM109 ist. Demzufolge wurde das fusionierte Protein, das von dem rekombinanten Expressionsvektor pGNHB-A exprimiert wurde, als eine Bande von etwa 48 kDa identifiziert.

<Beispiel 7> Konstruktion des rekombinanten Expressionsvektors pGNC-PreS1 und Oberflächenexpression der Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-PreS1-Antigen bildet

(1) Ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, exprimieren kann, wurde unter Verwendung des C-terminalen pgsC-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

Das pgsC-Gen enthält die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 2.

Um das N-terminale und C-terminale Gen, das für das pgsA-Protein unter den Proteinen der äußeren Zellmembran, die an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt sind, kodiert, zu erhalten, wurde das gesamte Chromosom als die Matrize eingesetzt, und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 15 am N-Terminus und von SEQ ID NO: 16 am C-Terminus enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet.

Der Primer, der dem N-Terminus entspricht und die Sequenz von SEQ ID NO: 15 enthält, war auch so konstruiert, dass er die Erkennungsstelle des Restriktionsenzyms Ndel umfasst, die im Oberflächenexpressionsvektor pHCE19T(II) vorhanden ist, während der Primer, der die Sequenz von SEQ ID NO: 16 enthält, so konstruiert wurde, dass er die Erkennungsstelle des Restriktionsenzyms BamHI umfasst, die im Oberflächenexpressionsvektor pHCE19T(II) vorhanden ist. An diesem Punkt war die amplifizierte Genregion von der N-terminalen Region des pgsC-Gens für das Protein der äußeren Membran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, bis zur C-terminalen Region von pgsC etwa 0,45 kb groß. Die durch die Polymerasekettenreaktion amplifizierten Gene wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und Ndel verdaut und in den schon mit BamHI und Ndel verdauten, konstitutiv hoch exprimierenden Expressionsvektor pHCE19T(II) inseriert, wodurch ein neuer, pGNC genannter Expressionsvektor, etwa 4,1 kb groß, mit neuen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen und ohne Terminationskodon am Ende des Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, geschaffen wurde (siehe [Fig. 7](#)).

(2) Der rekombinante Expressionsvektor pGNC-PreS1, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-PreS1-Oberflächenantigen bildet, exprimieren kann, wurde auch konstruiert. Genauer gesagt, wurde der rekombinante Expressionsvektor durch Ausnutzung der N-terminalen Sequenz des pgsC-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Protein-Gen, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, und unter Verwendung eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle hergestellt.

Um das Hepatitis B-Virus-PreS1-Antigen-Gen in den Oberflächenexpressionsvektor pGNC zu inserieren, indem ein Gram-negatives Bakterium als die Wirtszelle genutzt wird, wurden etwa 1,5 kb des Hepatitis-Virus-Gens, kloniert im allgemeinen Klonierungsvektor pUC18, als die Matrize ausgewählt, und Oligonucleotide mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 17 und SEQ ID NO: 18 wurden als die Primer zur Amplifikation des S-Antigen-Gens durch eine Polymerasekettenreaktion verwendet. An diesem Punkt wurde die amplifizierte Genregion 356 bp groß. Die Primer mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 17 und SEQ ID NO: 18 wurden auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme HindIII und BamHI, die im Oberflächenexpressionsvektor pGNC vorhanden sind, enthalten. Die amplifizierten Gene des Hepatitis B-Virus-PreS1-Antigens wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut und an die N-terminalen Region des pgsC-Gens aus dem Gen der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, im Oberflächenexpressionsvektor pGNC, der bereits durch Anpassung der Translationskodons vorbereitet worden war, ligiert. Der im Obenstehenden konstruierte rekombinante Expressionsvektor pGNC-PreS1 ist in [Fig. 7](#) dargestellt.

(3) Die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, unter Verwendung des Oberflächenexpressionsvektors pGNC-PreS1 wurde wie folgt untersucht:

Der Oberflächenexpressionsvektor wurde in die E. coli-Wirtszelle transformiert, und Expression wurde unter Verwendung des gleichen Verfahrens, das oben in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde die Identifizierung einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das PreS1-Antigen bildet, fusioniert mit dem pgsC-Protein der äußeren Zellmembran, die in der E. coli-Transformante exprimiert wurde, auf der Basis von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das PreS1-Antigen durchgeführt (siehe [Fig. 8](#)).

[0088] Wie in [Fig. 8](#) dargestellt, ist Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, während Bahnen 2 und 3 die Zelltransformante pGNC-PreS1/JM109 sind. Als ein Ergebnis wurde das fusionierte Protein, das von dem rekombinanten Expressionsvektor pGNC-Pre1 exprimiert wird, als eine Bande von etwa 27 kDa identifiziert.

<Beispiel 8> Konstruktion der rekombinanten Oberflächenexpressionsvektoren pHCE1LB:BCA und pHCE1LB:BCA-HB168 und Oberflächenexpression von Antigendeterminanten, die einen neutralisierenden Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-S-Antigen bilden

(1) Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:BCA, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des C-terminalen pgsC-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem Bacillus

sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

Das Plasmid pHCE1LB wurde als Klonierungsvektor ausgewählt, da es sich replizieren bzw. vervielfältigen kann und sowohl in Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien selektiert werden kann. Der Expressionsvektor pHCE1LB bestand aus einem konstitutiv hoch exprimierenden HCE-Promotor plus den in der Klonierungsstelle enthaltenen verschiedenen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen, in Gram-negativen Bakterien replizierbare Replikationsstartpunkte ("origins") und Antibiotika-Resistenzmarker für Ampicillin. Zusätzlich bestand der Expressionsvektor pHCE1LB aus Replikationsstartpunkten, die in Gram-positiven Bakterien replizierbar sind, die von *Lactobacillus* sp. abgeleitet sind, und Antibiotika-Resistenzmarkern für Chloramphenicol.

Um die N-terminalen und C-terminalen Gene, die für das pgsBCA-Protein kodieren, aus den Proteinen der äußeren Zellmembran, die an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt sind, zu erhalten, wurde das gesamte Chromosom als die Matrize eingesetzt, und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 4 am N-Terminus und SEQ ID NO: 5 am C-Terminus enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet. An diesem Punkt war die amplifizierte Genregion von der N-terminalen Region des pgsB-Gens für das Protein der äußeren Membran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, bis zur C-terminalen Region von pgsA etwa 2,8 kb groß. Die durch die Polymerasekettenreaktion amplifizierten Gene wurden mit den Restriktionsenzymen Ncol und BamHI verdaut und in den Expressionsvektor pHCE1LB, der bereits mit BamHI und Ncol verdaut war, inseriert, wodurch ein neuer Expressionsvektor, genannt pHCE1LB:BCA, etwa 8 kb groß, mit neuen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen, ohne Terminationskodon am Ende des Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist und das sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien als Wirtszelle verwendet, geschaffen wurde (siehe [Fig. 9](#)).

(2) Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Oberflächenantigen bildet, exprimieren kann, wurde ebenfalls konstruiert. Genauer gesagt wurde der rekombinante Expressionsvektor unter Anwendung des gleichen Verfahrens, wie es oben beschrieben ist, durch Ausnutzung des pgsBCA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, und unter Verwendung eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle hergestellt.

Der im Obenstehenden konstruierte rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 ist in [Fig. 9](#) dargestellt.

(3) Die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, unter Verwendung des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:BCA-HB168 und *Salmonella typhi* Ty21a als dem Gram-negativen Wirt wurde wie folgt untersucht:

Der Oberflächenexpressionsvektor wurde in die *Salmonella typhi* Ty21a-Wirtszelle transformiert, und Expression wurde unter Anwendung des gleichen Verfahrens, wie es oben in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde die Identifizierung einer Antigendeterminante, die auf der Zelloberfläche von *Salmonella typhi* Ty21a exprimiert wurde, auf der Basis des Fraktionierungsverfahrens der äußeren Membran durch Abtrennen der löslichen Fraktion, der inneren Membran-Fraktion und der äußeren Membran-Fraktion und durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das S-Antigen durchgeführt. Als ein Ergebnis wurde bestätigt, dass die Produktion einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, die mit pgsA fusioniert ist und einer 48 kDa-Bande entspricht, in der äußeren Membran-Fraktion der *Salmonella typhi* Ty21a-Fraktionen lokalisiert ist (siehe [Fig. 10](#)). Wie in [Fig. 10](#) dargestellt, ist Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle, Bahn 2 ist die ganze Zelle der Zelltransformante und die Bahnen 3, 4 und 5 sind die lösliche Fraktion, die innere Membran-Fraktion bzw. die äußere Membran-Fraktion der Zelltransformante.

[0089] Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, durch Durchführung von fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS)-Durchflusszytometrie verifiziert. Zu diesem Zweck wurde das gleiche Verfahren, wie es oben in Beispiel 3 beschrieben ist, verwendet, das ein Antigendeterminante-Protein auf der Oberfläche offenbarte, was vom Ergebnis für die nicht-transformierte *Salmonella typhi* Ty21a verschieden war (siehe [Fig. 10](#)). Wie in [Fig. 10](#) dargestellt, stellt Schwarz ohne einen Pfeil die nicht-transformierte *Salmonella typhi* Ty21a dar, während Schwarz mit einem Pfeil die transformierte *Salmonella typhi* Ty21a darstellt. Als ein Ergebnis wies die mit dem Oberflächenexpressionsvektor transformierte *E. coli*-Transformante eindeutig die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, auf der Zelloberfläche auf.

<Beispiel 9> Untersuchung von Vakzinwirksamkeit in Mikroben, die eine Antigendeterminante, die neutralisierende Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, auf der Zelloberfläche exprimieren

[0090] Der rekombinante Vektor pHCE1LB:BCA-HB168, in Beispiel 8 für Oberflächenexpression konstruiert, wurde in das Gram-negative Bakterium *Salmonella typhi* Ty21a transformiert, und Expression auf der Zelloberfläche wurde unter Anwendung des gleichen Verfahrens, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Danach wurde die Antigenität der Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, fusioniert mit dem Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, gemessen.

[0091] Im Wesentlichen wurde der rekombinante Vektor pHCE1LB:BCA-HB168 zur Oberflächenexpression in *Salmonella typhi* Ty21a transformiert, und die Expression des oben genannten Antigens wurde untersucht. Danach wurde einiges des *Salmonella*-Stammes in die Nasenhöhle von BALB/c-Mäusen verabreicht bzw. appliziert, dann wurde(n) nach mehreren Tagen (1) das Blutserum der Mäuse gesammelt und das Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen das S-Antigen im Serum untersucht und (2) die Organe der Mäuse gesammelt, dann das Vorhandensein von IgA-Antikörpern gegen das S-Antigen in der Suspensionslösung, die verwendet wurde, um die Organe zu waschen, unter Verwendung einer enzymgekoppelten Immunadsorptionsbestimmung (ELISA) untersucht.

[0092] An diesem Punkt wurden die geernteten Zellen mehrere Male unter Verwendung eines PBS-Puffers (pH 7,4) gewaschen und auf die gleiche Zellkonzentration eingestellt, dann wurden 2×10^9 *Salmonella typhi* Ty21a, auf denen die Antigene Oberflächen-exprimiert worden waren, zweimal mit einem dreitägigen Intervall dazwischen in der Nasenhöhle von 4~6 Wochen alten BALB/c-Mäusen verabreicht. Nach 4 Wochen wurden zwei weitere Injektionen mit einem 3-tägigen Intervall dazwischen verabreicht, dann wurde 2 Wochen später das Blutserum der Mäuse und die Lösung, die verwendet wurde, um die Organe zu waschen, gesammelt und auf der Basis des ELISA-Verfahrens unter Verwendung des S-Antigens auf ihre Antikörpertiter gegen die Antigene gemessen (siehe [Fig. 11](#)).

[0093] Wie in [Fig. 11](#) dargestellt, zeigt Graph A die IgG-Antikörpertiter gegen die S-Antigendeterminante im Blutserum: d.h., die Titer der nicht-transformierten *Salmonella*, Titer der mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformierten *Salmonella* und Titer der mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:HB168 transformierten *Salmonella*. In [Fig. 11](#) zeigt Graph B die IgA-Antikörpertiter gegen die S-Antigendeterminante in den Organen: d.h., die Titer der nicht-transformierten *Salmonella*, Titer der mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:HB168 transformierten *Salmonella* und Titer der mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformierten *Salmonella*.

[0094] Wie in [Fig. 11](#) gezeigt, wiesen das Blutserum und die Lösung, die zum Waschen der Organe verwendet wurde, aus der BALB/c-Mäusegruppe, der die mit dem Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:BCA168 transformierte *Salmonella typhi* Ty21a-Transformante verabreicht worden war, viel höhere Antikörpertiter bezüglich IgG und IgA auf, was von den Ergebnissen der anderen Gruppen verschieden war.

[0095] Demnach wurde bestätigt, dass die Mikroben der vorliegenden Erfindung, die eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, auf einer Zelloberfläche exprimieren, als ein wirksamer Lebendimpfstoff funktionieren bzw. wirken.

<Beispiel 10> Oberflächenexpression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, auf einem Gram-positiven Bakterium, das mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformiert ist

[0096] Die Oberflächenexpression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, auf dem Gram-positiven Bakterium *Lactobacillus casei*, das mit dem rekombinanten Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168, der, wie es in Beispiel 8 beschrieben ist, zur Oberflächenexpression konstruiert ist, transformiert ist, wurde untersucht.

[0097] Der für die Oberflächenexpression verwendete rekombinante Expressionsvektor, wie obenstehend hergestellt, wurde in *Lactobacillus casei* transformiert und (dieser) in einem stationären Zustand in einem 500 ml-Kolben kultiviert, der 200 ml eines MRS-Mediums enthielt, plus 50 mg/l des Antibiotikums Chloramphenicol zum Induzieren der Oberflächenexpression.

[0098] Um die Antigendeterminante, die auf der Zelloberfläche von *Lactobacillus casei* sitzt, zu lokalisieren,

wurden die Zelltransformanten unter Anwendung des Zellwand-Fraktionierungsverfahrens in Fraktionen, z.B. das Zell-Cytoplasma und Zellwand etc., aufgetrennt und mittels Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das S-Antigen untersucht. Im Wesentlichen wurden die zum Exprimieren der fusionierten Proteine auf der Zelloberfläche induzierte Lactobacillus-Transformante und der nicht-transformierte Lactobacillus auf der Basis der gleichen Zellkonzentration geerntet, mehrfach unter Verwendung eines TES-Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 25% Saccharose) gewaschen, unter Verwendung von destilliertem Wasser, enthaltend 5 mg/ml Lysozym, 1 mM PMSF und 1 mM EDTA, suspendiert, dann mehrmals gefroren und aufgelöst bei -60°C bzw. Raumtemperatur. Die resultierenden Zellen wurden unter Verwendung einer Ultraschallsonde durch Zusatz von 0,5 mg/ml DNase und 0,5 mg/ml RNase aufgebrochen. Danach wurde die Ultraschall-behandelte Zellsuspension bei 4°C für 20 Minuten bei 10.000 × g zur Auftrennung in ein Ganz-Lactobacillus-Pellet ("whole Lactobacillus pellet") (Ganzzellfraktion), d.h., nicht Ultraschall-behandelt, und Zell-Debris (Überstand) zentrifugiert, dann wieder bei 4°C für eine Stunde bei 21.000 × g zentrifugiert, um einen Überstand, enthaltend die cytoplasmatischen Proteine von Lactobacillus, und ein Zellpellet zu sammeln. Das resultierende Zellpellet wurde in einem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 7,4), enthaltend 1% SDS, suspendiert, um die Zellwandproteine (Zellwandfraktionen) von Lactobacillus zu sammeln.

[0099] Jede Fraktion wurde untersucht, um die Orte auf der Zellwand, an denen eine Antigendeterminante einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildete, durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunblotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das S-Antigen zu bestätigen (siehe [Fig. 12A](#)). Wie in [Fig. 12](#) dargestellt, sind Bahnen 1, 3 und 5 der nicht-transformierte Lactobacillus casei, Bahn 2 ist die ganze Zelle von Lactobacillus casei, der mit dem Expressionsvektor pHCE1B:BCA-HB168 transformiert ist, und die Bahnen 4 und 6 sind die lösliche Fraktion bzw. Zellwandfraktion der transformierten Zelle.

[0100] Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression der Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, durch den C-Terminus des Poly-γ-glutamat-Synthetase-Proteins durch Durchführung von fluoreszenzaktivierter Zellsortierungs (FACS)-Durchflusszytometrie verifiziert. Zu diesem Zweck wurde das gleiche Verfahren verwendet, wie es für Beispiel 3 beschrieben ist, welches ein Antigendeterminante-Protein auf der Zelloberfläche offenbarte bzw. zeigte, was vom Ergebnis für den nicht-transformierten Lactobacillus verschieden ist (siehe [Fig. 12B](#)). Wie in [Fig. 12B](#) dargestellt, ist die weiße Bande der nicht-transformierte Lactobacillus, während die schwarze Bande von dem Lactobacillus abgeleitet ist, der mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformiert ist. Als ein Ergebnis wies die mit dem Oberflächenexpressionsvektor transformierte Lactobacillus-Transformante deutlich die Expression einer Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das S-Antigen bildet, auf der Zelloberfläche auf.

<Beispiel 11> Untersuchung der Vakzinwirksamkeit 2 in Mikroben, die eine Antigendeterminante, die neutralisierende Antikörper gegen Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, auf einer Zelloberfläche exprimieren

[0101] Der in Beispiel 8 für Oberflächenexpression konstruierte rekombinante Vektor pHCE1LB:BCA-HB168 wurde in das Gram-positive Bakterium Lactobacillus casei transformiert, und die Expression auf der Zelloberfläche wurde unter Anwendung des gleichen Verfahrens, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Danach wurde die Antigenität der Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, die mit dem Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, gemessen.

[0102] Im Wesentlichen wurde der für Oberflächenexpression geschaffene rekombinante Vektor pHCE1LB:BCA-HB168 in Lactobacillus casei transformiert, (dieser wurde) geerntet, um die gleiche Zellkonzentration zu erreichen, und mehrfach unter Verwendung eines PBS-Puffers (pH 7,4) gewaschen. Dann wurden der Mundhöhle von 4~6 Wochen alten BALB/c-Mäusen dreimal mit einem Tag Abstand dazwischen 5×10^{10} Lactobacillus-Zellen, auf denen die Antigene Oberflächen-exprimiert worden waren, verabreicht, dann wurden nach 4 Wochen 3 weitere Injektionen mit einem Tag Abstand gegeben. Zusätzlich wurden der Nasenhöhle von BALB/c-Mäusen 1×10^{10} Lactobacillus-Zellen, auf denen die Antigene Oberflächen-exprimiert worden waren, zweimal mit einem 3-tägigen Abstand dazwischen und nach 4 Wochen 2 weitere Injektionen mit einem 3-tägigen Abstand dazwischen verabreicht. Zwei Wochen nach den oralen und nasalen Verabreichungen wurde das (1) Blutserum der Mäuse gesammelt, und die IgG-Antikörpertiter gegen das S-Antigen wurden untersucht, und (2) die Organe der Mäuse wurden gesammelt und die IgA-Antikörpertiter gegen das S-Antigen in der Suspensionslösung, die verwendet wurde, um die Organe zu waschen, unter Verwendung einer enzymgekoppelten Immunadsorptionsbestimmung (siehe [Fig. 13](#)).

[0103] Wie in [Fig. 13](#) dargestellt, zeigt Graph A die IgG-Antikörpertiter gegen die S-Antigendeterminante für das Blutserum: d.h., die Titer des mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformierten Lactobacillus in der Gruppe mit nasaler Verabreichung ("nasal administered group"), Titer des mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformierten Lactobacillus in der Gruppe mit oraler Verabreichung ("oral administered group"), Titer des mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:HB168 (in dem das pgsBCA-Gen deletiert ist und von dem HB168 in den Zellen exprimiert werden kann) transformierten Lactobacillus in der Gruppe mit oraler Verabreichung und Titer des nicht-transformierten Lactobacillus in der Gruppe mit oraler Verabreichung. In [Fig. 13](#) zeigt Graph B die IgA-Antikörpertiter gegen die S-Antigendeterminante für die Organe: d.h., die Titer des nicht-transformierten Lactobacillus, Titer des mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:HB168 transformierten Lactobacillus, Titer des mit dem Expressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformierten Lactobacillus. Die Experimente wurden unter Verwendung getrennter Gruppen durchgeführt: Gruppe mit nasaler Verabreichung und Gruppe mit oraler Verabreichung.

[0104] Wie es in [Fig. 11](#) gezeigt wurde, wies das Blutserum und die zum Waschen der Organe verwendete Lösung aus der BALB/c-Mäuse-Gruppe, der die mit dem Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:BCA-HB168 transformierte Lactobacillus-Transformante verabreicht wurde, viel höhere Antikörpertiter bei IgG und IgA auf, was von den Ergebnissen der Vergleichsgruppen verschieden war.

[0105] Dementsprechend wurde bestätigt, dass die Mikroben der vorliegenden Erfindung, die eine Antigen-determinante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, auf einer Zelloberfläche exprimieren, als ein wirksamer Lebendimpfstoff wirken.

<Beispiel 12> Konstruktion des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A

[0106] Ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Antigendeterminante, die einen neutralisierenden Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-S-Antigen bildet, exprimieren kann, wurde unter alleiniger Verwendung des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Gen, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem Bacillus sp.-Stamm abgeleitet ist, konstruiert: d.h., der Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, der Gram-negative oder Gram-positive Bakterien als Wirtszelle nutzen kann.

[0107] Um die N-terminalen und C-terminalen Gene, die für das pgsA-Protein unter den Proteinen der äußeren Zellmembran, die an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt sind, kodieren, zu erhalten, wurde das gesamte Chromosom als die Matrize eingesetzt, und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 10 am N-Terminus und von SEQ ID NO: 5 am C-Terminus enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet.

[0108] An diesem Punkt war die amplifizierte Genregion von der N-terminalen Region des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, bis zur C-terminalen Region etwa 1,1 kb. Die durch die Polymerasekettenreaktion amplifizierten Gene wurden mit den Restriktions-enzymen Ndel und BamHI verdaut und in den bereits mit BamHI und Ndel verdauten Expressionsvektor pHCE1LB inseriert, wodurch ein neuer Expressionsvektor, pGNCA genannt, etwa 6,3 kb groß, mit neuen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen, ohne Terminationskodon am Ende des Gens des Proteins der äußeren Zellmembran und mit der Fähigkeit, sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien als Wirtszelle zu nutzen, geschaffen wurde (siehe [Fig. 14](#)).

<Beispiel 13> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-TGEN1 und Oberflächenexpression von TGE N-Antigen

[0109] Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-TGEN1, der ein Nucleoprotein bzw. Kernprotein (N)-Antigen des Transmissible-Gastroenteritis-Virus (TGE), der übertragbare gastrische Erkrankungen bei Schweinen ("porcine transmissible gastric diseases") auslöst, auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsA-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem Bacillus sp.-Stamm abgeleitet ist, und Gram-negativer oder Gram-positiver Bakterien als Wirtszelle konstruiert.

[0110] Um die Antigendeterminante-Hauptregion ("major antigenic determinant region") der N-Antigen-Gene des TGE-Virus in den Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, wie er in Beispiel 12 hergestellt wurde, einzuführen, wobei Gram-negative oder Gram-positive Bakterien als Wirtszelle verwendet wurden, wurden etwa 1,1 kb des TGE-Virus-Gens in den allgemeinen Klonierungsvektor pUC8 kloniert und als die Matrize ausgewählt, und Oligonucleotide mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 19 und SEQ ID NO: 20 wurden als

die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, um das S-Antigen-Gen zu amplifizieren. Als ein Ergebnis wurde ein 415 bp großes amplifiziertes Genfragment erhalten. An diesem Punkt wurden die Primer mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 19 und SEQ ID NO: 20 auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII, die im Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A vorhanden sind, enthalten.

[0111] Danach wurde das amplifizierte N-Antigen-Gen des TGE-Virus mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und mit der bereits vorbereiteten C-terminalen Region des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran im Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A durch Anpassen der Translationskodons ligiert. Der resultierende rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-TGEN1 ist in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0112] Die Oberflächenexpression des TGE-Virus-N-Antigens wurde mit *E. coli* und *Lactobacillus* unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-TGEN1 untersucht. Zu diesem Zweck wurde der rekombinante Expressionsvektor in *E. coli* und *Lactobacillus* transformiert, und die Expression durch das gleiche Verfahren, wie es oben beschrieben ist, induziert. Die Expression des TGE-N-Antigens, das mit dem Protein der äußeren Zellmembran fusioniert ist, auf der Zelloberfläche wurde dann durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunblotting unter Verwendung eines Antikörpers gegen das TGE-N-Antigen bzw. das pgsA-Protein bestätigt (siehe [Fig. 15](#)).

[0113] Wie in [Fig. 15](#) dargestellt, ist in A Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, und Bahnen 2 und 3 sind die Zelltransformante pHCE1LB:A-TGEN1/JM109, während in B Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle *Lactobacillus casei* ist und Bahnen 2 und 3 die *Lactobacillus casei*-Transformante pHCE1LB:A-TGEN1 sind. Als ein Ergebnis wurde festgestellt, dass die Bande, die dem fusionierten Protein, das von dem Expressionsvektor pHCE1LB:A-TGEN1 produziert wird, entspricht, etwa 57 kDa groß ist.

<Beispiel 14> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-PEDN und Oberflächenexpression von PED N-Antigen

(1) Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-PEDN, der ein Nucleoprotein (N)-Antigen des porcinen epidemischen Diarrhoe-Virus (PED), der übertragbare gastrische Erkrankungen bei Schweinen auslöst, auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsA-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly-γ-glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und Gram-negativer oder Gram-positiver Bakterien als Wirtszelle, konstruiert.

Um die Antigendeterminante-Region der N-Antigen-Gene des PED-Virus in den Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, wie er in Beispiel 12 hergestellt wurde, einzuführen, wobei Gram-negative oder Gram-positive Bakterien als Wirtszelle verwendet wurden, wurden etwa 1,3 kb des PED-Virus-Gens in den allgemeinen Klonierungsvektor pUC8 kloniert und als die Matrize ausgewählt, und Oligonucleotide mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 21 und SEQ ID NO: 22 wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, um das S-Antigen-Gen zu amplifizieren. Als ein Ergebnis wurde ein 1326 bp großes amplifiziertes Genfragment erhalten. An diesem Punkt wurden die Primer mit den Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 21 und SEQ ID NO: 22 auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII, die im Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A vorhanden sind, enthalten.

Danach wurde das amplifizierte N-Antigen-Gen des PED-Virus mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und mit der durch Anpassung der Translationskodons bereits vorbereiteten C-terminalen Region des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran im Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A ligiert. Der resultierende rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-PEDN ist in [Fig. 14](#) dargestellt.

(2) Die Oberflächenexpression des PED-Virus-N-Antigens auf *E. coli* und *Lactobacillus* wurde unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-PEDN untersucht. Zu diesem Zweck wurde der rekombinante Expressionsvektor in *E. coli* und *Lactobacillus* transformiert, und die Expression durch das gleiche Verfahren, wie es oben beschrieben ist, induziert. Dann wurde die Expression des PED-N-Antigens, das mit dem pgsA-Protein der äußeren Zellmembran fusioniert ist, auf der Zelloberfläche durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunblotting unter Verwendung eines Antikörpers gegen das PED-N-Antigen bzw. das pgsA-Protein bestätigt (siehe [Fig. 16](#)).

[0114] Wie in [Fig. 16](#) dargestellt, ist in A Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, und Bahnen 2 und 3 sind die Zelltransformante pHCE1LB:A-TGEN1/JM109, während in B Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle *Lactobacillus casei* ist, Bahn 2 die *Lactobacillus casei*-Transformante pHCE1LB:A ist und Bahn 3 die Lac-

tobacillus casei-Transformante pHCE1LB:A-PEDN ist.

[0115] Wie es in den Figuren beschrieben ist, wurde festgestellt, dass die Bande, die dem fusionierten Protein, das von dem Expressionsvektor pHCE1LB:A-PEDN produziert wird, entspricht, etwa 90 kDa groß ist.

<Beispiel 15> Analyse der Vakzinwirksamkeit 2 in Lactobacillus, der N-Antigen von TGE-Virus und von PED-Virus auf der Zelloberfläche exprimiert

[0116] Die rekombinanten Vektoren pHCE1LB:A-TGEN1 und pHCE1LB:A-PEDN, die in den Beispielen 13 bzw. 14 für die Oberflächenexpression konstruiert wurden, wurden in das Gram-positive Bakterium Lactobacillus casei transformiert und Expression auf der Zelloberfläche wurde durch das gleiche Verfahren, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Danach wurden die Antigenitäten des TGE-Virus-N-Antigens und des PED-Virus-N-Antigens, die mit dem pgsA-Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, fusioniert sind, gemessen.

[0117] Im Wesentlichen wurden die für Oberflächenexpression geschaffenen rekombinanten Vektoren pHCE1LB:A-TGEN1 und pHCE1LB:A-PEDN in Lactobacillus casei transformiert, (dieser wurde) geerntet, um die gleiche Zellkonzentration zu erreichen, und mehrfach unter Verwendung eines PBS-Puffers (pH 7,4) gewaschen. Dann wurden 5×10 Zellen des Lactobacillus-Stammes, auf dem die N-Antigene Oberflächen-exprimiert worden waren, dreimal mit einem eintägigen Abstand dazwischen oral und unabhängig an 4–6 Wochen alte BALB/c-Mäuse verabreicht, dann nach einer Woche dreimal mit einem eintägigen Abstand dazwischen injiziert. Vier Wochen nach der ersten Verabreichung wurde (1) das Blutserum der Mäuse gesammelt und die Produktion von IgG-Antikörpern gegen die N-Antigene durch Durchführung von Western-Blotting mit den N-Antigenen untersucht (siehe [Fig. 17](#)).

[0118] Infolgedessen wurde, wie es in [Fig. 17](#) dargestellt ist, festgestellt, dass das Blutserum der BALB/c-Mäuse-Gruppe, der die Lactobacillus-Transformante transformiert, entweder mit dem Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A-TGN1 (A) oder pHCE1LB:A-PEDN (B), verabreicht worden war, Antikörper gegen die N-Antigene umfasste.

<Beispiel 16> Konstruktion des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-PreS1 und Oberflächenexpression von PreS1-Antigen

(1) Ein rekombinanter Expressionsvektor, der das PreS1-Antigen aus dem Hepatitis B-Virus-S-Antigen auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde konstruiert, wobei nur das pgsA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Gen, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem Bacillus sp.-Stamm abgeleitet ist, d.h., der Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A-PreS1, der sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien als Wirtszelle nutzen kann, verwendet wurde. Um die PreS1-Antigendeterminante aus den Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigenen in den Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, wie er in Beispiel 12 hergestellt wurde, einzuführen, wobei Gram-positive oder Gram-negative Bakterien als die Wirtszelle verwendet werden, wurden etwa 1,5 kb des Hepatitis B-Virus-Gens in den allgemeinen Klonierungsvektor pUC8 kloniert und als die Matrize eingesetzt, und Oligonukleotide, die die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 17 und SEQ ID NO: 18 enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet.

An diesem Punkt wurde das amplifizierte HBV-S-Antigen-Gen mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und in den Expressionsvektor pHCE1LB:A, vorbereitet durch Anpassung des Translationskodons, am C-Terminus des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran ligiert, wodurch ein neuer rekombinanter Expressionsvektor, pHCE1LB:A-PreS1 genannt, geschaffen wurde, wie in [Fig. 18](#) dargestellt.

(2) Die Oberflächenexpression des HBV-PreS1-Antigens wurde in E. coli unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-PreS1 untersucht. Zu diesem Zweck wurde der rekombinante Expressionsvektor in E. coli transformiert, und Expression wurde unter Anwendung des gleichen Verfahrens, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde die Expression des PreS1-Antigens, das mit dem pgsA-Protein der äußeren Zellmembran fusioniert ist, auf der Zelloberfläche durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunblotting unter Verwendung eines Antikörpers gegen das PreS1-Antigen bestätigt (siehe [Fig. 20](#), in A).

[0119] Wie es in [Fig. 20](#) in A dargestellt ist, ist Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, und Bahn 2 ist die Zelltransformante pHCE1LB:A-PreS1/JM109.

[0120] Als ein Ergebnis wurde festgestellt, dass die Bande, die dem fusionierten Protein, das von dem Expressionsvektor pHCE1LB:A-TGEN1 produziert wird, entspricht etwa 55 kDa groß ist.

<Beispiel 17> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-PreS2

[0121] Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-PreS2, der das PreS2-Antigen aus den Hepatitis B-Virus-Oberflächen-Antigenen auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsA-Gens des pgsBCA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -Glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und Gram-negativer oder Gram-positiver Bakterien als Wirtszelle konstruiert.

[0122] Um die Antigendeterminante-Region der PreS2-Antigen-Gene des Hepatitis B-Virus in den Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, wie er in Beispiel 12 hergestellt wurde, einzuführen, wobei Gram-negativer oder Gram-positive Bakterien als die Wirtszelle verwendet werden, wurden etwa 1,3 kb des Hepatitis B-Virus-Gens in den allgemeinen Klonierungsvektor pUC8 kloniert und als die Matrize ausgewählt, und Oligonukleotide, die die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 23 und SEQ ID NO: 24 enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer PCR verwendet, um das PreS2-Antigen-Gen zu amplifizieren. An diesem Punkt war die amplifizierte Genregion etwa 165 bp groß. Die Primer mit SEQ ID NO: 23 und SEQ ID NO: 24 wurden auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII umfassen, die im Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A vorhanden sind.

[0123] Das PreS2-Antigen-Gen des HBV, das durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert wurde, wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und in die C-terminale Region des pgsA-Gens für das Protein der äußeren Zellmembran im Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, der bereits verdaut worden war, um das Translationskodon anzupassen, inseriert, wodurch der neue rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-PreS2 geschaffen wurde, wie er in [Fig. 18](#) dargestellt ist.

<Beispiel 18> Konstruktion des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 und Oberflächenexpression von PreS1-Antigen

(1) Ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine fusionierte Form des PreS1-Antigens und des PreS2-Antigens aus den Hepatitis B-Virus-Oberflächen-Antigenen auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde konstruiert, wobei nur das pgsA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran aus dem pgsBCA-Gen, das an der Synthese von Poly- γ -Glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, verwendet wurde: d.h., der Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A-PreS1:PreS2, der Gram-negative oder Gram-positive Bakterien als die Wirtszelle verwenden kann.

Um die PreS1- und PreS2-Antigendeterminanten aus den Hepatitis B-Virus-Oberflächen-Antigenen in den Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, wie er in Beispiel 12 hergestellt wurde, einzuführen, wobei Gram-positive oder Gram-negative Bakterien als Wirtszelle verwendet werden, wurden etwa 1,5 kb des Hepatitis B-Virus-Gens in den allgemeinen Klonierungsvektor pUC8 kloniert und als die Matrize eingesetzt, und Oligonukleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 17 und SEQ ID NO: 24 enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet. An diesem Punkt war die amplifizierte Region der Gene 522 bp groß.

Die amplifizierten HBV-PreS1:PreS2-Antigen-Gene wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und in den Expressionsvektor pHCE1LB:A, der durch Anpassen des Translationskodons am C-Terminus des pgsA-Gens des Proteins der äußeren Zellmembran vorbereitet wurde, ligiert, wodurch der neue rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 geschaffen wurde, wie er in [Fig. 19](#) dargestellt ist.

(2) Die Oberflächenexpression der HBV-PreS1- und PreS2-Antigene wurde in *E. coli* unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 untersucht. Zu diesem Zweck wurde der rekombinante Expressionsvektor in *E. coli* transformiert, und Expression wurde unter Anwendung des gleichen Verfahrens, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde die Expression des PreS1:PreS2-Antigens, das mit dem pgsA-Protein der äußeren Zellmembran fusioniert ist, auf der Zelloberfläche durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunblotting unter Verwendung eines Antikörpers gegen das PreS1-Antigen bestätigt (siehe [Fig. 20](#), in A).

[0124] Wie es in [Fig. 20](#) in A dargestellt ist, ist in A Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109 und Bahn 3 ist die Zelltransformante pHCE1LB:A-PreS1:PreS2/JM109.

[0125] Als ein Ergebnis wurde festgestellt, dass die Bande, die dem fusionierten Protein entspricht, das von

dem Expressionsvektor pHCE1LB:A-TGEN1 produziert wird, etwa 60 kDa groß ist.

<Beispiel 19> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-L und Oberflächenexpression von L-Antigen

(1) Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-L, der eine fusionierte Form bzw. Fusionsform der PreS1-, PreS2- und S-Antigene aus den Hepatitis B-Virus-Oberflächen-Antigenen auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsA-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem Bacillus sp.-Stamm abgeleitet ist, und Gram-positiver oder Gram-negativer Bakterien als Wirtszelle konstruiert. Die Primer mit SEQ ID NO: 25 wurden auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII umfassen, die in dem Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A-L vorhanden sind. Das amplifizierte L-Gen des Hepatitis B-Virus wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut und an die durch Anpassung der Translationskodons vorbereitete C-terminale Region des pgsA-Gens aus dem Gen der äußeren Zellmembran ligiert. Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-L ist in [Fig. 19](#) dargestellt.

(3) Die Oberflächenexpression des L-Antigens als ein fusioniertes Antigen bzw. Fusionsantigen, zusammengesetzt aus den PreS1-, PreS2- und S-Antigenen, unter Verwendung des Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-L wurde in *E. coli* untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Oberflächenexpressionsvektor in *E. coli*-Wirtszellen transformiert, und Expression wurde unter Anwendung des gleichen Verfahrens, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Dann wurde die Expression des L-Antigens, das mit dem pgsA-Protein der äußeren Zellmembran fusioniert ist, in der *E. coli*-Transformante durch Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting unter Verwendung von Antikörpern gegen das PreS1-Antigen bestätigt (siehe [Fig. 20](#), B). Wie in [Fig. 20](#) dargestellt, ist Bahn 1 die nicht-transformierte Wirtszelle JM109, und Bahnen 2 und 3 sind die Zelltransformante pHCE1LB:A/JM109.

[0126] Als ein Ergebnis wurde das fusionierte Protein, das ausgehend von dem rekombinanten Expressionsvektor pHCE1LB:A-L exprimiert wird, als eine Bande von etwa 86 kDa identifiziert.

<Beispiel 20> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pHCE1LB:A-TNF- α

[0127] Der rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-TNF- α , der eine fusionierte Form des Tumornekrosefaktors α (TNF- α), ein Protein zur pharmazeutischen und klinischen Verwendung, auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsA-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem Bacillus sp.-Stamm abgeleitet ist, und Gram-positiver oder Gram-negativer Bakterien als Wirtszelle konstruiert.

[0128] Um das TNF- α -Gen in den Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A, wie er in Beispiel 12 konstruiert wurde, einzuführen, wobei Gram-positive oder Gram-negative Bakterien als die Wirtszelle verwendet werden, wurden etwa 0,5 kb des TNF- α -Gens in den allgemeinen Klonierungsvektor pUC8 kloniert und als die Matrix eingesetzt, und Oligonukleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 26 und SEQ ID NO: 27 enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet. An diesem Punkt war der amplifizierte Bereich der Gene 482 bp groß. Die Primer mit SEQ ID NO: 26 und SEQ ID NO: 27 wurden auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII umfassen, die in dem Oberflächenexpressionsvektor pHCE1LB:A vorhanden sind.

[0129] Das amplifizierte L-Gen des Hepatitis B-Virus wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut und durch Anpassen der Translationskodons mit der C-terminalen Region des Gens der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, ligiert. Der im Obenstehenden konstruierte rekombinante Expressionsvektor pHCE1LB:A-TNF- α ist in [Fig. 21](#) dargestellt.

<Beispiel 21> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pGNA-Lipase und Oberflächenexpression von Lipase

[0130] Der rekombinante Expressionsvektor pGNA-Lipase, der das Enzym Lipase auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsA-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem Bacillus sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

[0131] Um das Lipase-Gen in den Oberflächenexpressionsvektor pGNA einzuführen, wobei ein Gram-nega-

tives Bakterium als die Wirtszelle verwendet wird, wurden etwa 0,5 kb des Lipase-Gens in den allgemeinen Klonierungsvektor pUC8 kloniert und als die Matrize eingesetzt, und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 28 und SEQ ID NO: 29 enthalten, wurden als die Primer zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion verwendet. An diesem Punkt war die amplifizierte Region der Gene 546 bp groß. Die Primer mit SEQ ID NO: 28 und SEQ ID NO: 29 wurden auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII umfassen, die in dem Oberflächenexpressionsvektor pGNA vorhanden sind.

[0132] Das amplifizierte L-Gen des Hepatitis B-Virus wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut und durch Anpassen der Translationskodons mit der C-terminalen Region des Gens der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, ligiert. Der im Obenstehenden konstruierte rekombinante Expressionsvektor pGNA-Lipase ist in [Fig. 22](#) dargestellt.

(2) Die Oberflächenexpression des Lipase-Gens in *E. coli* wurde unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pGNA-Lipase untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Expressionsvektor pGNA-Lipase in *E. coli* transformiert, und Expression wurde durch das gleiche Verfahren, wie es in Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Danach wurde die enzymatische Aktivität der Lipase, die auf der Zelloberfläche exprimiert wird, auf einem Agarmedium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,619% NaCl, 0,5% Gummi arabicum, 1 mM CaCl, 1% Tricaprylin), enthaltend 1% Tricaprylin anhand Öl-Abbauaktivität, untersucht. Die *E. coli*-Transformante wurde auf dem Agarmedium, enthaltend 1% eines Ölsubstrats, ausgestrichen, dann wurde sie in einem Dauerzustand ("sustained state") bei 37°C für 9 Stunden kultiviert.

[0133] Als ein Ergebnis veränderte der Abbau des Ölsubstrats (das Medium) der durchsichtigen Bereiche (siehe [Fig. 22](#)), wodurch die Oberflächenexpression der Lipase auf der Zelloberfläche bestätigt wurde.

<Beispiel 22> Konstruktion des rekombinanten Oberflächenexpressionsvektors pGNA-Amidase und Oberflächenexpression von Amidase

(1) Der rekombinante Expressionsvektor pGNA-Amidase, der das Enzym Amidase auf einer Zelloberfläche exprimieren kann, wurde unter Verwendung des pgsA-Gens aus dem pgsBCA-Gen für das Protein der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp.-Stamm abgeleitet ist, und eines Gram-negativen Bakteriums als der Wirtszelle konstruiert.

Um das Amidase-Gen in den Oberflächenexpressionsvektor pGNA einzuführen, wobei ein Gram-negatives Bakterium als die Wirtszelle verwendet wurde, wurden etwa 0,8 kb des Amidase-Gens in den *E. coli*-Expressionsvektor pGNA kloniert und als die Matrize eingesetzt, und Oligonucleotide, die die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 30 und SEQ ID NO: 31 enthalten, wurden als Primer für eine Polymerasekettenreaktion verwendet. An diesem Punkt war die amplifizierte Region der Gene 792 bp groß. Die Primer mit SEQ ID NO: 30 und SEQ ID NO: 31 waren auch so konstruiert, dass sie die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII umfassen, die im Oberflächenexpressionsvektor pGNA vorhanden sind. Das amplifizierte L-Gen des Hepatitis B-Virus wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut und mit dem Oberflächenexpressionsvektor pGNA in der C-terminalen Region des Gens der äußeren Zellmembran, das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, durch Anpassung der Translationskodons ligiert. Der im Obenstehenden konstruierte rekombinante Expressionsvektor pGNA-Amidase ist in [Fig. 23](#) dargestellt.

(2) Die Oberflächenexpression des Amidase-Gens in *E. coli* wurde unter Verwendung des rekombinanten Expressionsvektors pGNA-Amidase untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Expressionsvektor pGNA-Amidase in *E. coli* transformiert, und Expression wurde durch das gleiche Verfahren, wie es für Beispiel 3 beschrieben ist, induziert. Danach wurde die Enzymaktivität der auf der Zelloberfläche exprimierten Amidase durch Zugabe der *E. coli* zu 100 mM einer Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,0), enthaltend 10 mM D-AlaNH als ein Substrat und 0,5 mM CoCl als einen Co-Faktor, untersucht. Genauer gesagt, wurden die *E. coli*, auf der die Amidase exprimiert worden war, nach Umsetzung für einige Stunden und nachdem der OD-Wert bei 600 nm für Zellwachstum 1 als ein Einheitsvolumen ("unit volume") war, unter Verwendung von HPLC (Hypersil ODS; 250 × 4,6 mm-Säule) untersucht. An diesem Punkt wurden Wildtyp-*E. coli* und die Zelltransformante, die den Oberflächenexpressionsvektor pGNA enthielt, eingesetzt, um die Enzymaktivitäten der auf der Zelloberfläche exprimierten Amidase zu vergleichen.

[0134] Wie in [Fig. 23](#) dargestellt, wurde festgestellt, dass die *E. coli*-Transformante der vorliegenden Erfindung 100 Mal mehr Amidase-Aktivität aufweist als die Kontrollgruppe. Folglich wurde bestätigt, dass das Verfahren zur Oberflächenexpression in der vorliegenden Erfindung Amidase wirksam auf der Zelloberfläche exprimiert.

GEWERBLICHE ANWENDBARKEIT

[0135] Wie es im Obenstehenden gezeigt und bestätigt wurde, können die neuartigen Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung ein exogenes Protein auf einer mikrobiellen Oberfläche durch Nutzung des Proteins der äußeren Zellmembran (pgsBCA), das an der Synthese von Poly- γ -glutamat beteiligt ist, das von einem *Bacillus* sp. abgeleitet ist, als einem Oberflächenexpressions-Träger wirksam produzieren und kann sowohl auf ein Gram-negatives als auch ein Gram-positives Bakterium stabil angewandt werden. Die mit dem Oberflächenexpressionsvektor transformierte Zelltransformante umfasst eine Insertionsstelle für das targetierte exogene Protein, dann wird die Ligation von Fremdgenen, die für das exogene Protein kodieren, hergestellt, und es wird kultiviert, um die Zelloberflächenexpression zu erleichtern bzw. zu ermöglichen.

[0136] Die Oberflächenexpressionsvektoren der vorliegenden Erfindung können wirksam zur stabilen und leicht detektierbaren Oberflächenexpression von verschiedenen exogenen Proteinen auf einer Zelloberfläche, ungeachtet des Zellzyklus, verwendet werden. Folglich kann das vorgeschlagene mikrobielle Oberflächenexpressionssystem eingesetzt werden, um verschiedene Antigene, rekombinante Antikörper, rekombinante Enzyme und Anheftungs- oder Adsorptionsproteine zu produzieren, zum Screening bzw. zur Durchmusterung verschiedener Antigene und Antikörper und zur Produktion von Enzymen zur biologischen Konversion. Im Wesentlichen können die Enzyme auf einer Zelloberfläche exprimiert und ohne jegliche Verringerung der Katalysator-Aktivität verwendet werden, was es erlaubt, die vorliegende Erfindung industriell bzw. gewerblich zum Zweck der Biokonversion anzuwenden.

[0137] Der Fachmann auf dem Gebiet wird anerkennen, dass die Konzepte und spezifischen Ausführungsformen, die in der vorangehenden Beschreibung offenbart sind, leicht als eine Grundlage für die Modifikation oder den Entwurf anderer Ausführungsformen verwendet werden können, um die gleichen Zwecke wie die vorliegenden Erfindung auszuführen.

Sequence Listing

<110> Bioleaders Corporation

M. D. LAB CO., LTD.

<120> SURFACE EXPRESSION VECTORS HAVING pgsBCA, THE GENE CODING POLY-GAMMA-GLUTAMATE SYNTHETASE, AND A METHOD FOR EXPRESSION OF TARGET PROTEIN AT THE SURFACE OF MICROORGANISM USING THE VECTOR

<130> E02-009

<150> KR2001-48373

<151> 2001-08-10

<160> §

<170> KoparentIn 1.71

<210> 1

<211> 1182

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 1

atggggctgggt ttcctttttt agccctggctt gtcatcttggg ttcacggaaat attggaaaaaa 60

cgcgcgacatc agaaaaaaatc tggatggcctc ccttttttttggg tggatattaa cggcatccgc 120

ggaaaaatcga ctgtgacaatg gctgtacaacc gggatattaa taaaagccgg taaaagacat 180

gtttttttttttt caacaggaac agatgtcaatg aatgtttttt gggacacacc ggaggaaaatg 240

ccggataaaac ggaaacctca ggggcccgtt atcggtggatc aaaaagaatg catgtggatgg 300

<210> 2
<211> 447
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

DE 602 15 521 T2 2007.06.21

<210> 4
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCT primer 1

<400> 4

gaaccatggg cgggtttc cttatggctt g

31

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 2

<400> 5

cicggatcc ttagattttta gttttttact

30

<210> 6

<211> 6536

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pGNBCA vector

<400> 6

gatcttccttcc tcacagatcc ccaatctttt gttttttttt gaaaaaggat caatcaaaaac

60

DE 602 15 521 T2 2007.06.21

DE 602 15 521 T2 2007.06.21

DE 602 15 521 T2 2007.06.21

taaaatggg taatgtcag accaaatata ctatataata ctatggatgg aatataatct 5400
 tttttttaa tttttttttt tttttttttt gatccctttt gataatctca tttttttttt 5460
 cccatcacgt gagttttcgt tccatcgatc gtcagatccc gtagaaaga taaaatggatc 5520
 ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5580
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5640
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5700
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5760
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5820
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5880
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5940
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6000
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6060
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6120
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6180
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6240
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6300
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6360

gtttcccgac tggaaaycgg gcaagggcgc caaccccaat aatggagat agtcacaca 6420

ttggccatcc caggcttac actttatgtt tccggcctgt atgggggg gaatgggg 6480

cggatcaaca aacacacag gaaacagca tgaccatgtt tccggcaagc tagtt 6536

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 3

<400> 7

cggggatccc aaggtaatgtt gccccggttt 29

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 4

<400> 8

tgaagctttt taggacgaaat ggatggaaat 30

Patentansprüche

1. Expressionsvektor zur Produktion eines Zielproteins auf einer mikrobiellen Zelloberfläche, der ein oder mehr als zwei Gene, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus pgsB, pgsC und pgsA, das bzw. die für einen Poly-γ-Glutamat-Synthetase-Komplex kodiert (kodieren), und ein Gen, das für ein Zielprotein kodiert, enthält.
2. Expressionsvektor nach Anspruch 1, worin die pgsB-, pgsC- und pgsA-Gene von einem *Bacillus* sp.-Stamm, der Poly-γ-Glutamat-Synthetase produziert, abgeleitet sind.
3. Expressionsvektor nach Anspruch 1, worin die Nucleotidsequenz der pgsB-, pgsC- und pgsA-Gene 80% Homologie zu SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 beziehungsweise SEQ ID NO: 3 hat.
4. Expressionsvektor nach Anspruch 1, worin das Gen, das für das Zielprotein kodiert, ausgewählt ist aus Genen, die für Enzyme, Antigene, Antikörper, Anheftungsproteine oder Adsorptionsproteine kodieren.

5. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zur Verwendung zum Transformieren Gram-negativer Bakterien.
6. Gram-negatives Bakterium, das mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 5 transformiert ist.
7. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Verwendung zum Transformieren Gram-positiver Bakterien.
8. Gram-positives Bakterium, das mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 7 transformiert ist.
9. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Verwendung zum Transformieren von sowohl Gram-negativen, als auch Gram-positiven Bakterien.
10. Verfahren zur Expression eines Zielproteins auf der mikrobiellen Zelloberfläche, wobei das Verfahren Kultivieren der transformierten Gram-negativen Bakterien nach Anspruch 6 umfasst.
11. Verfahren zur Expression eines Zielproteins auf der mikrobiellen Zelloberfläche, wobei das Verfahren Kultivieren der transformierten Gram-positiven Bakterien nach Anspruch 8 umfasst.

Es folgen 23 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

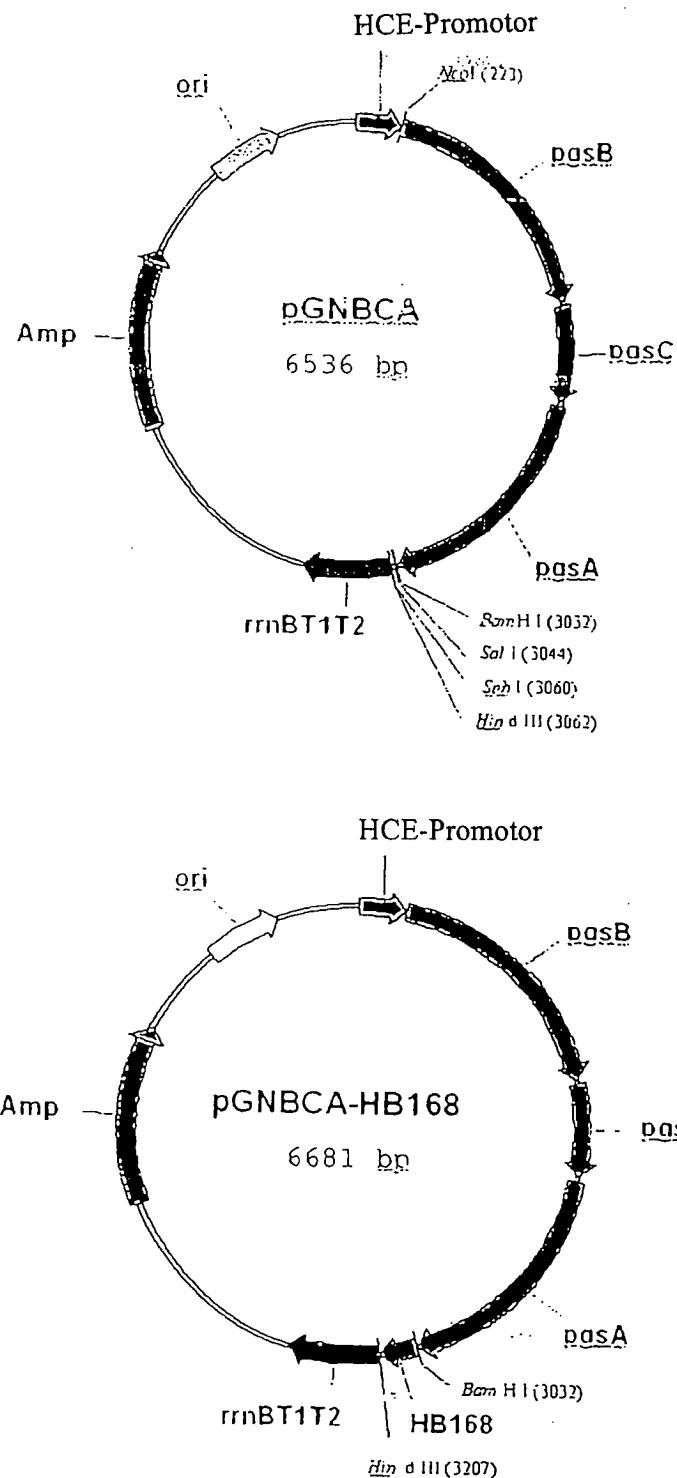


Fig. 1

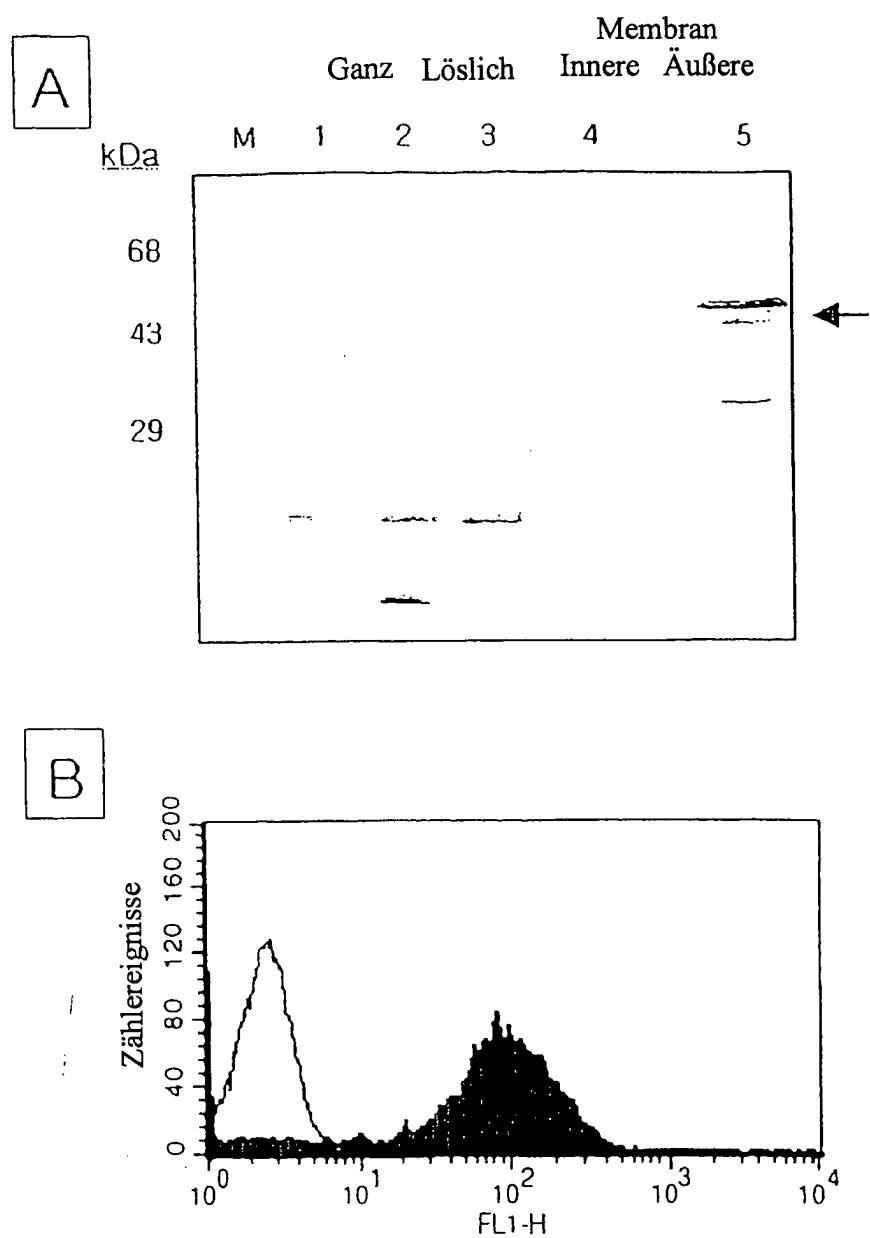


Fig. 2

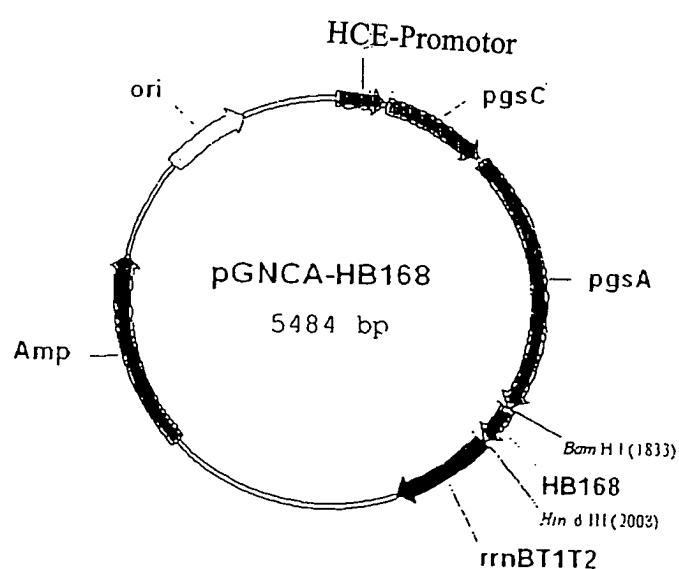
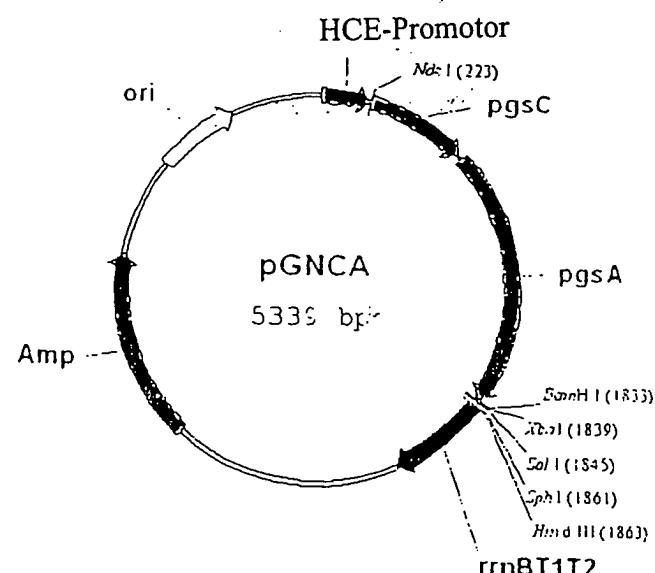
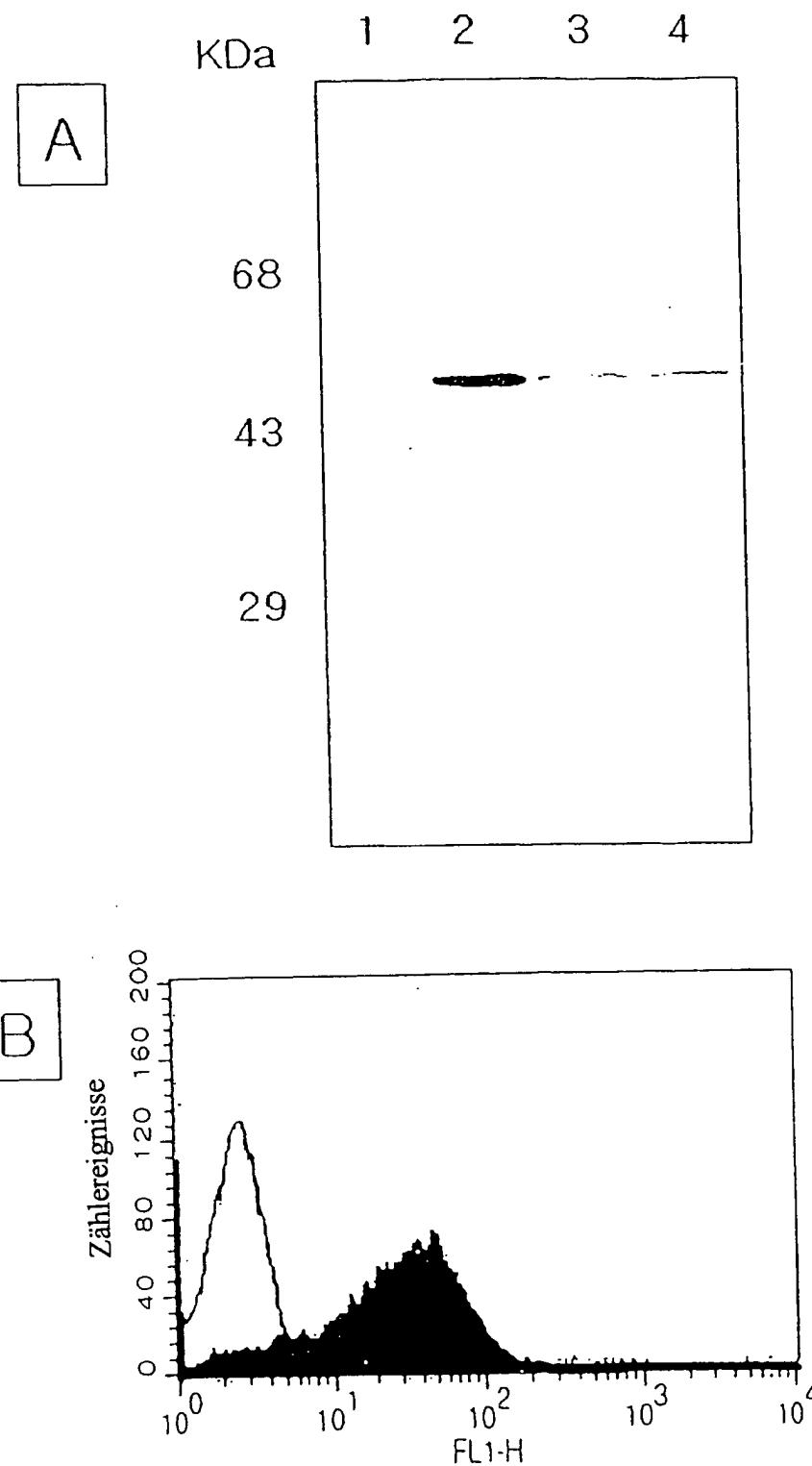


Fig. 3



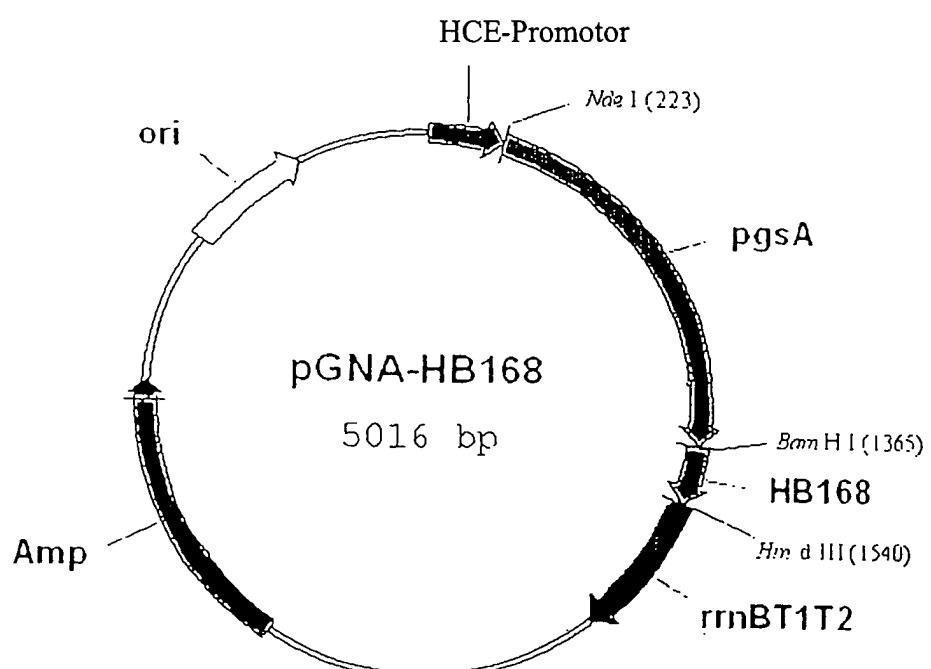
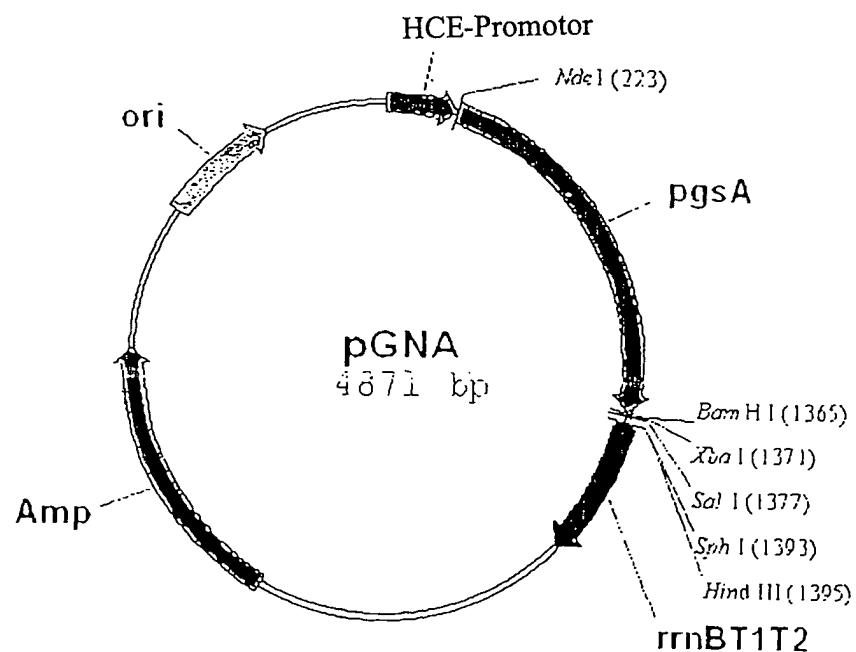


Fig. 5

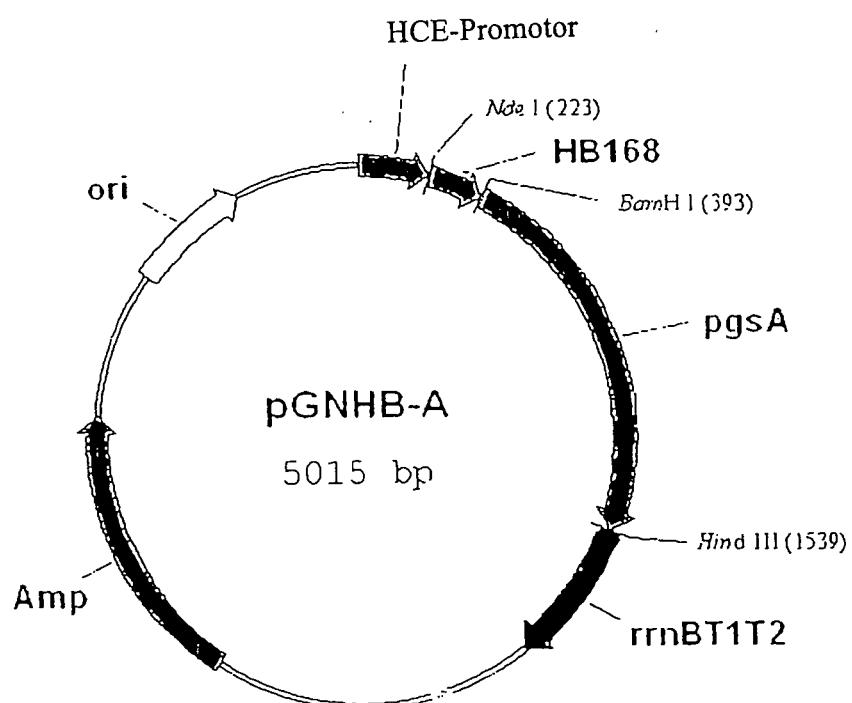
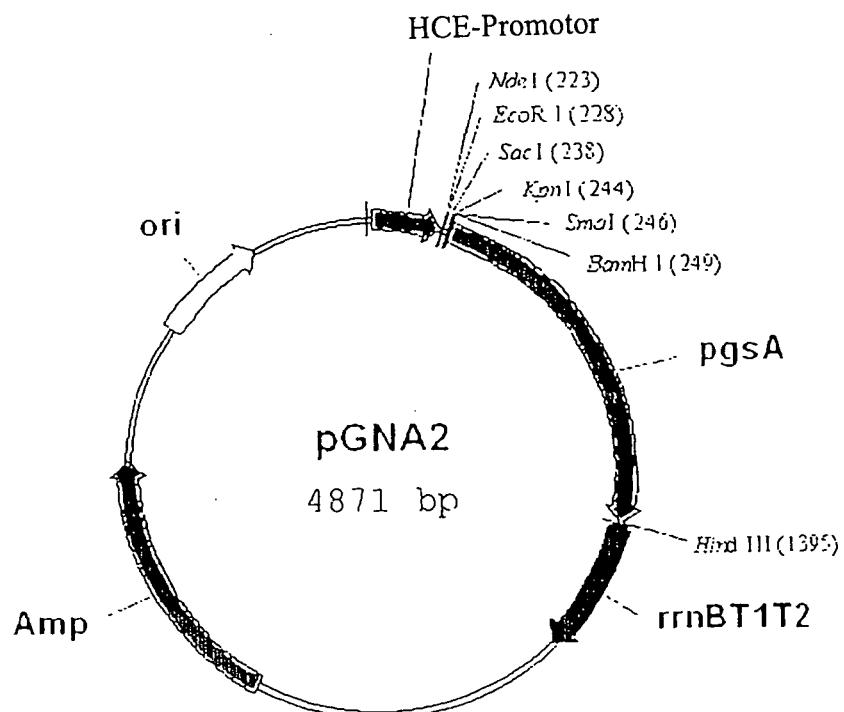


Fig. 6

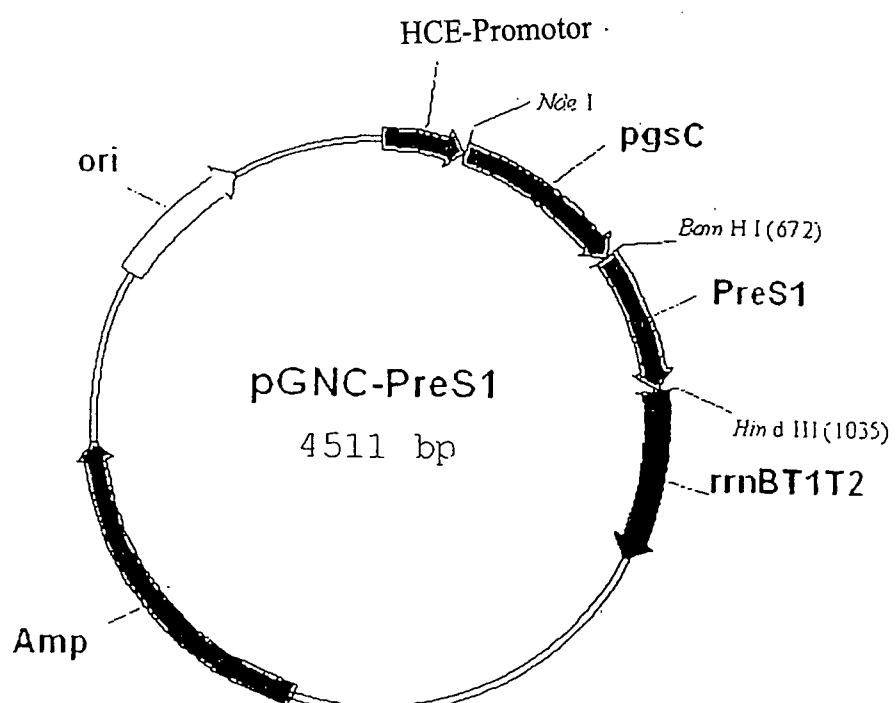
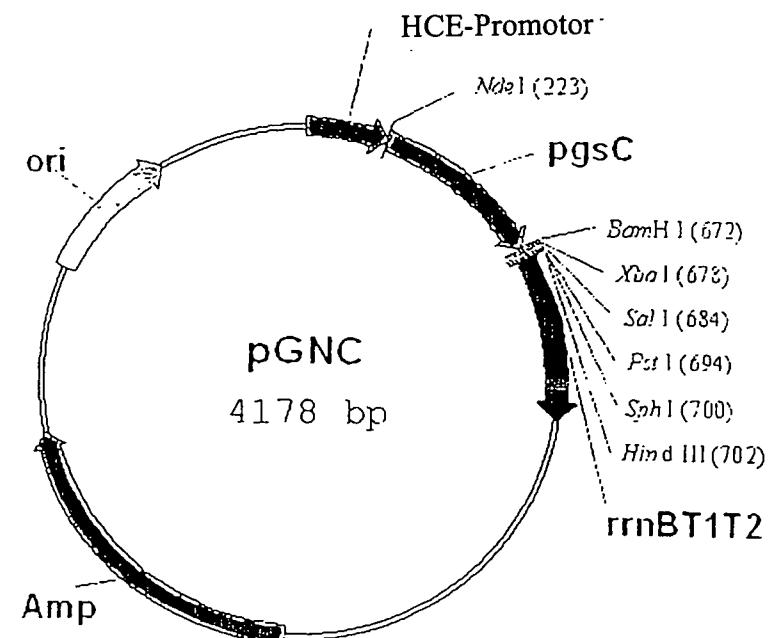


Fig. 7

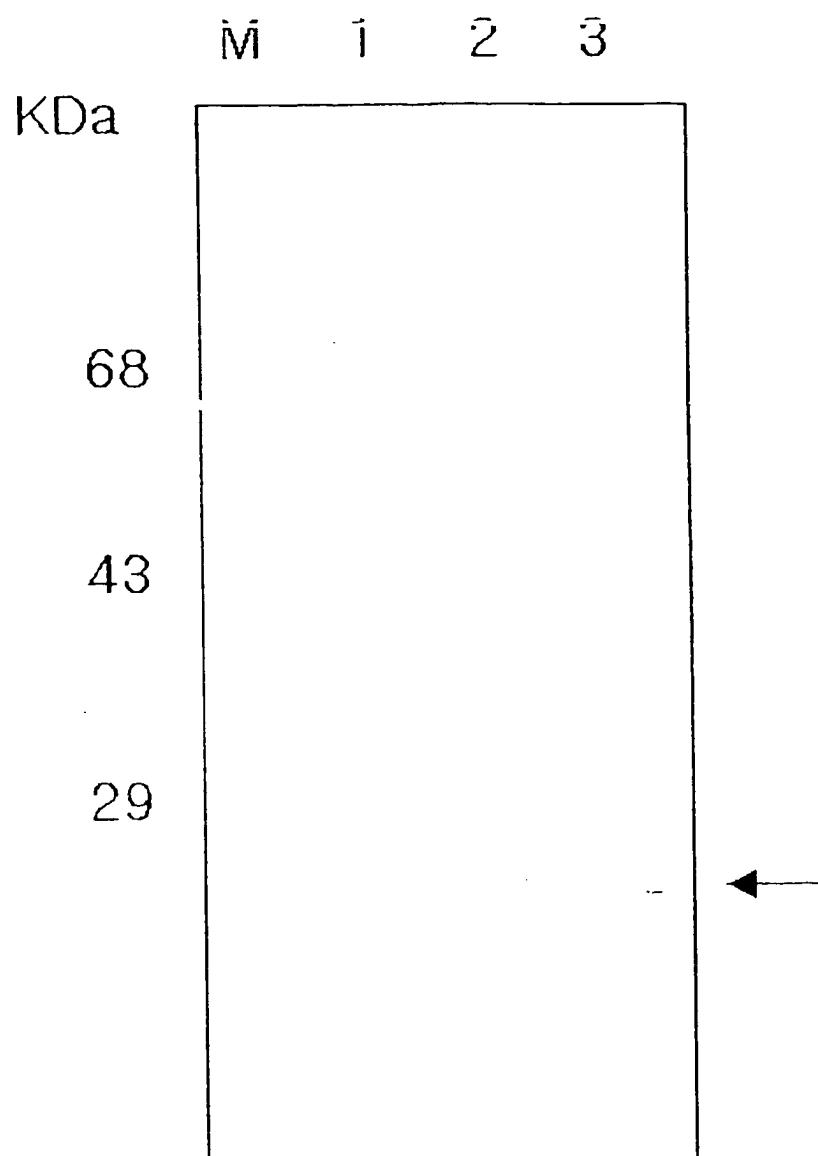


Fig. 8

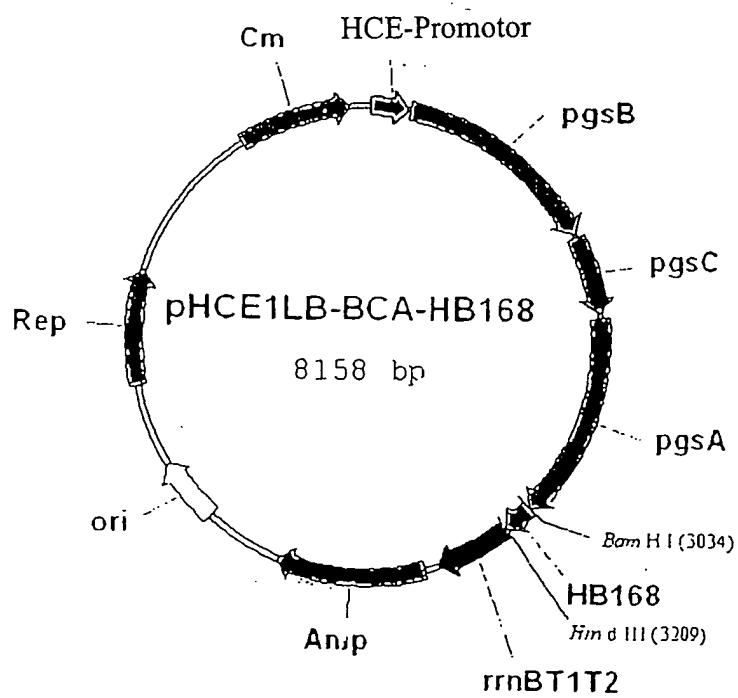
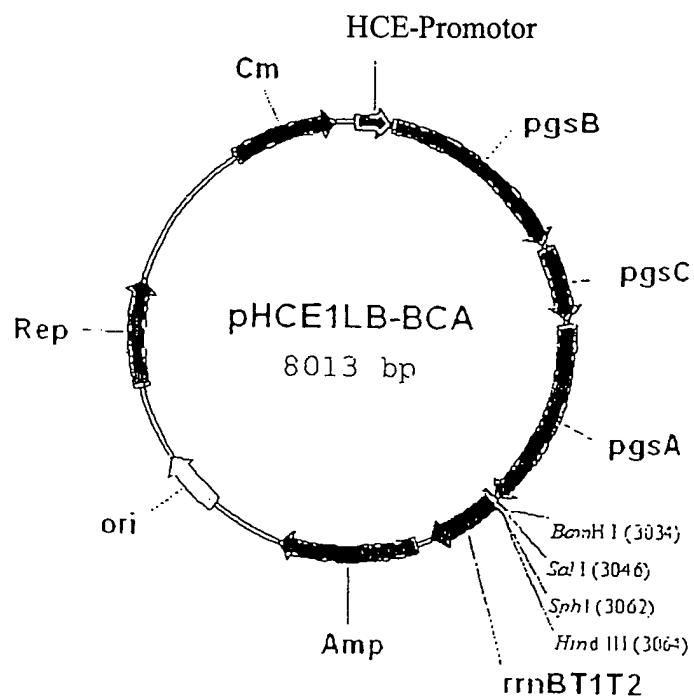


Fig. 9

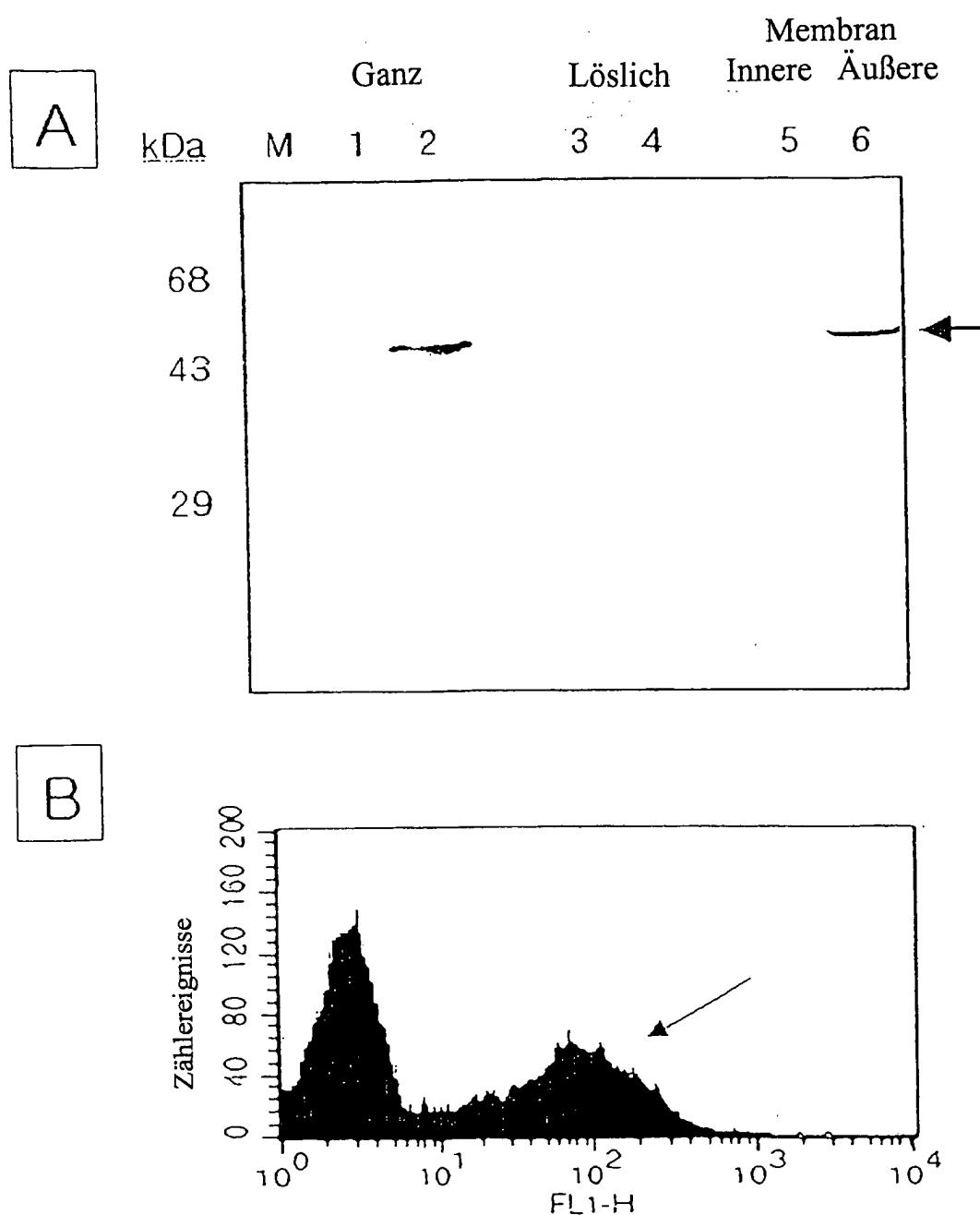


Fig. 10

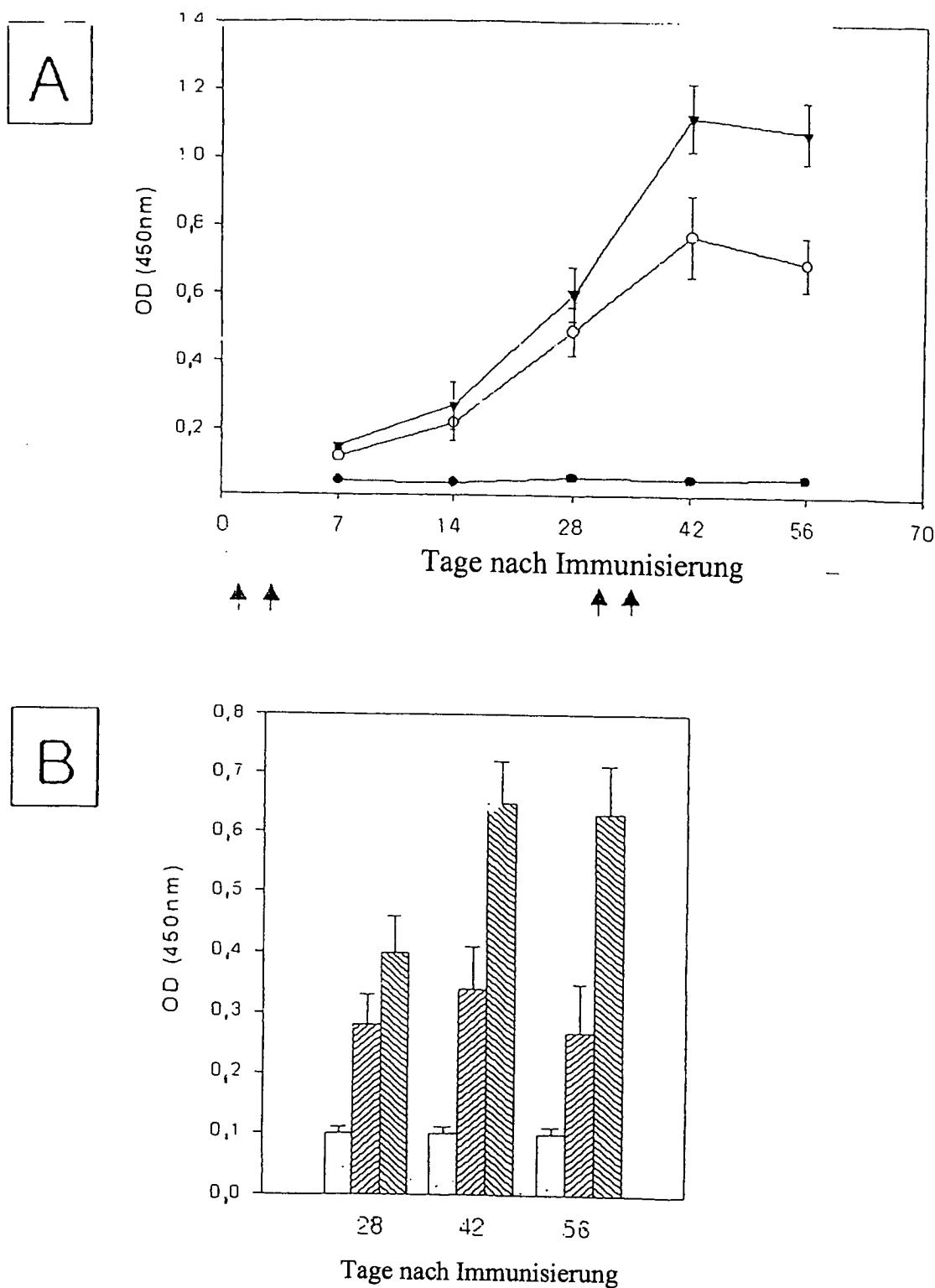


Fig. 11

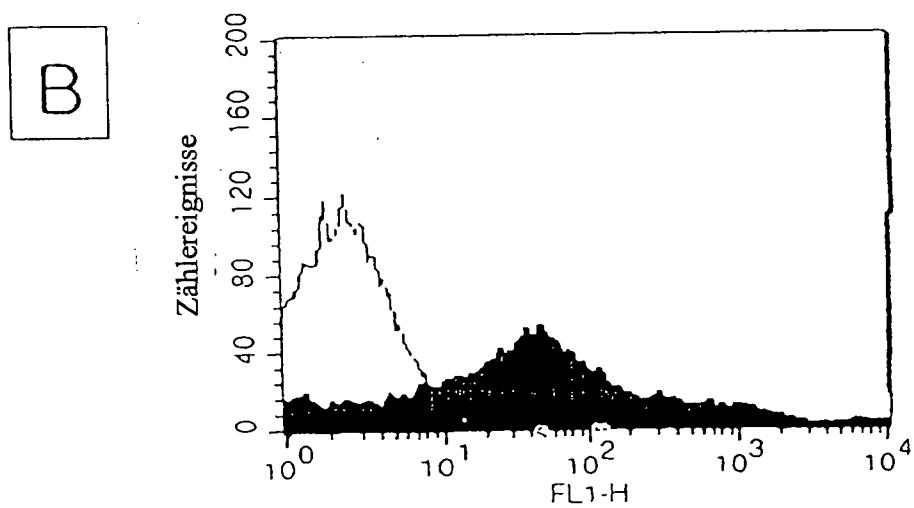
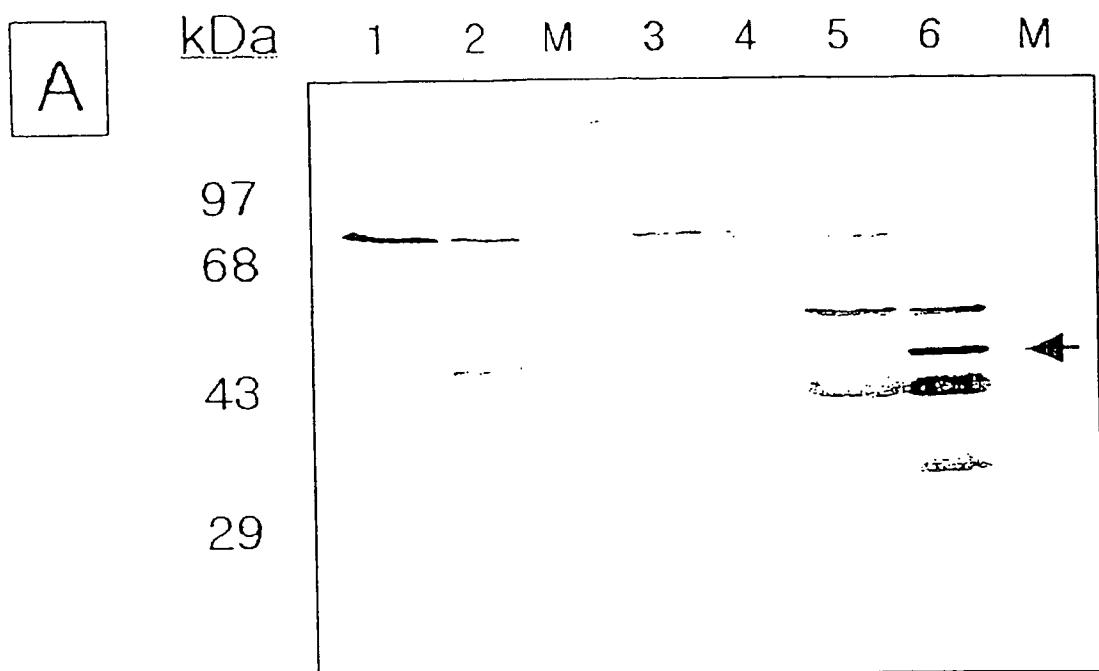


Fig. 12

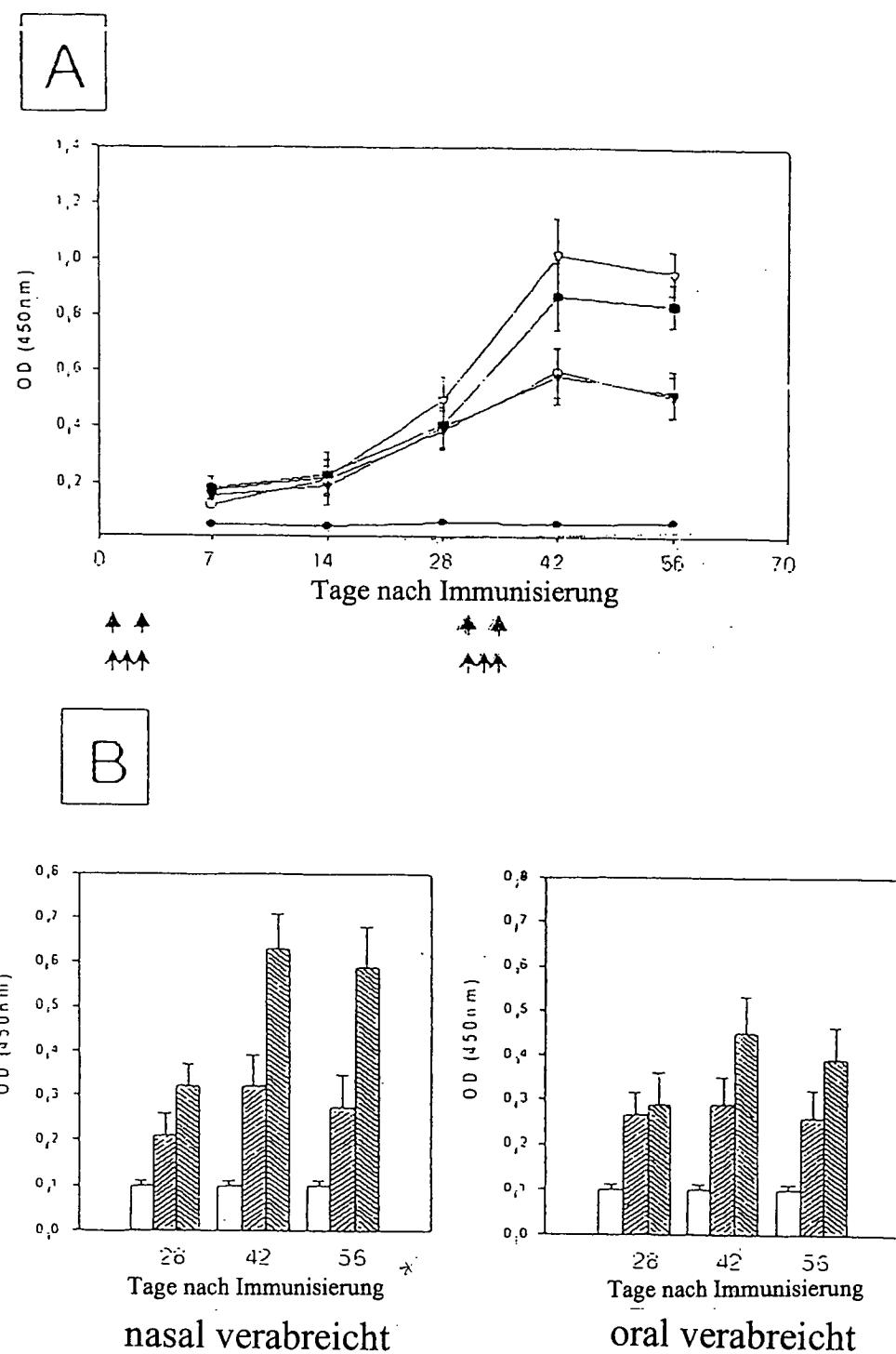


Fig. 13

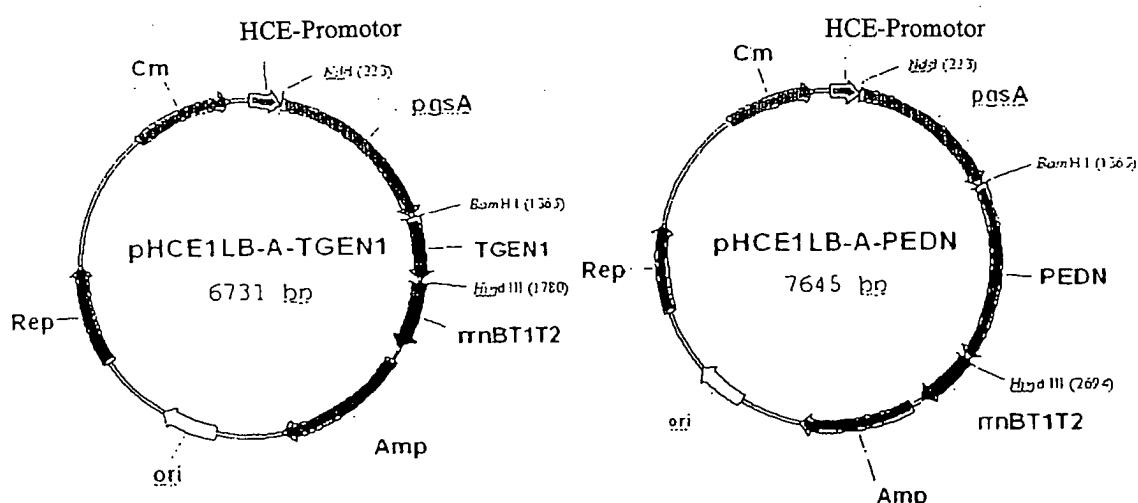
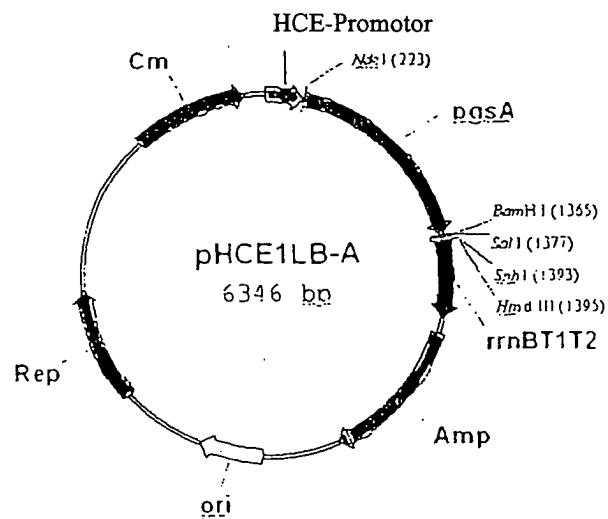


Fig. 14

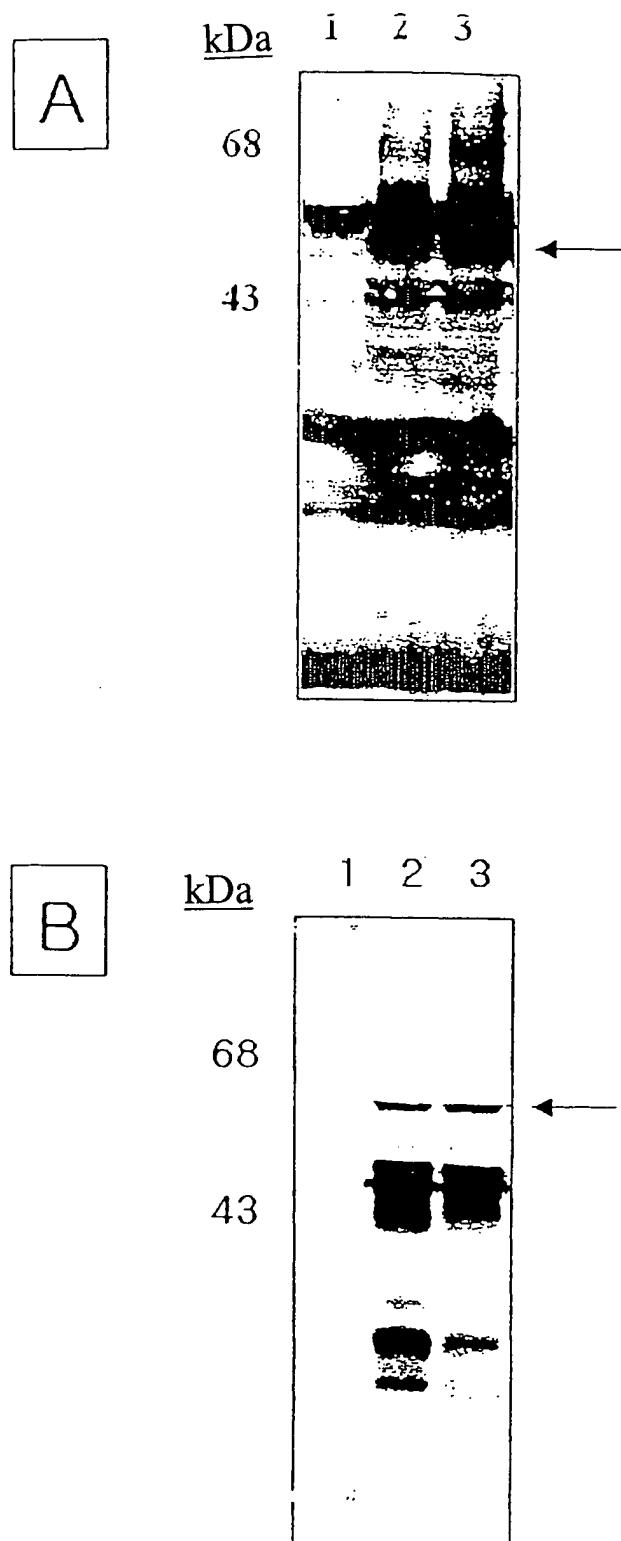


Fig. 15

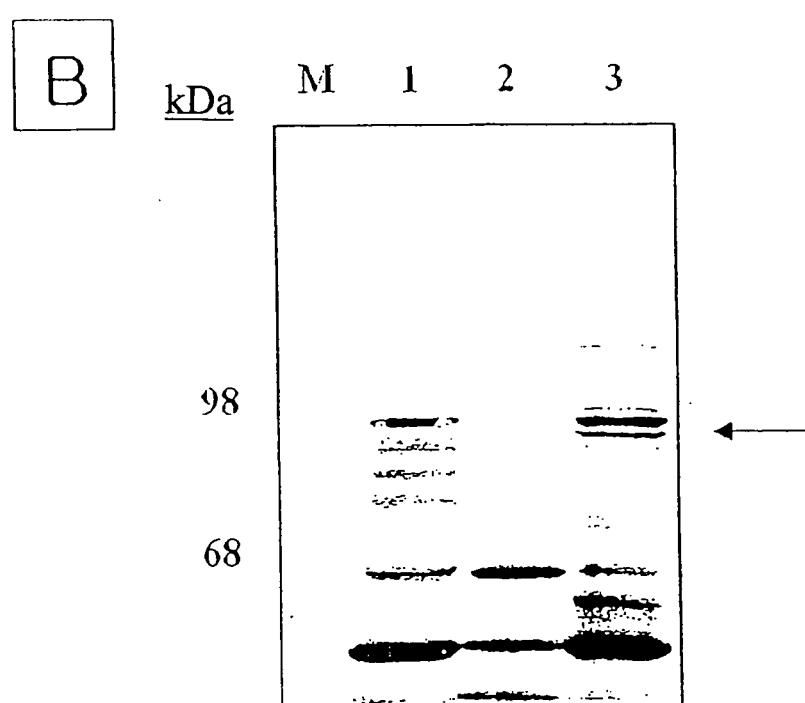
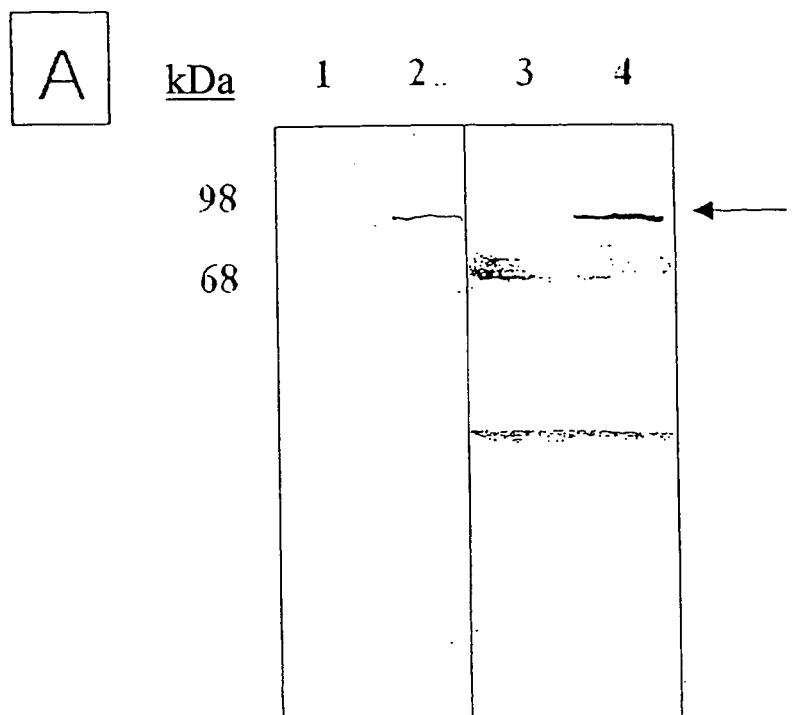


Fig. 16

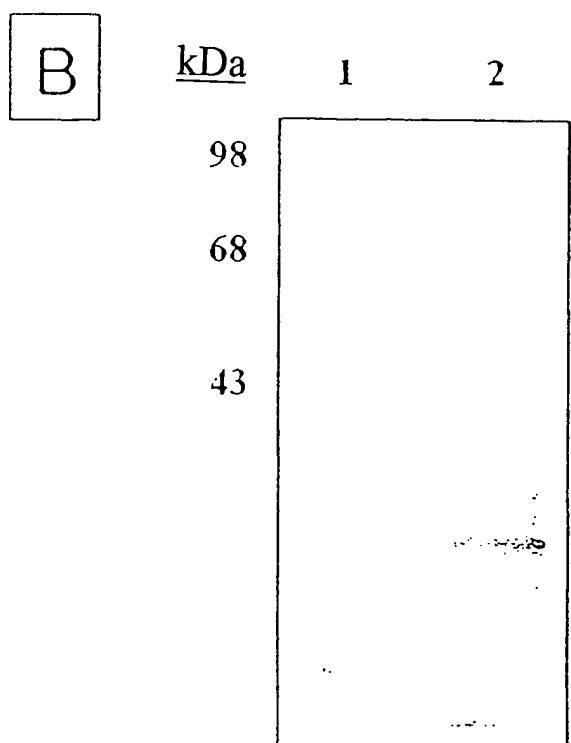
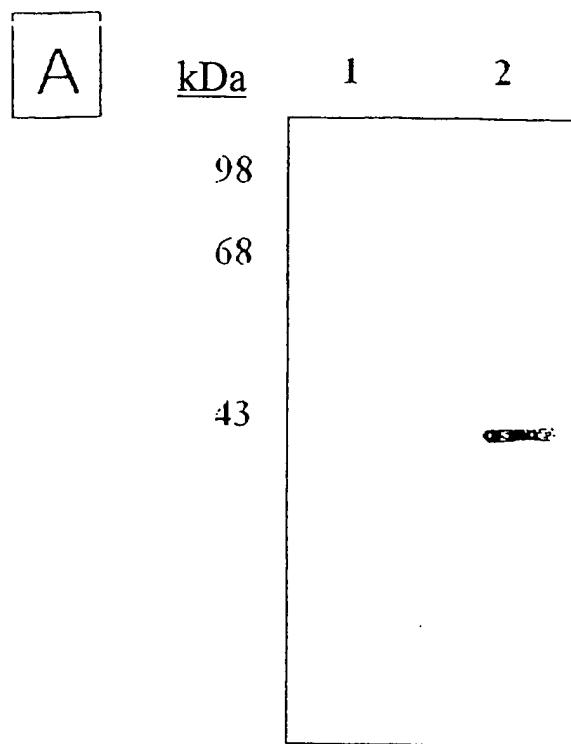


Fig. 17

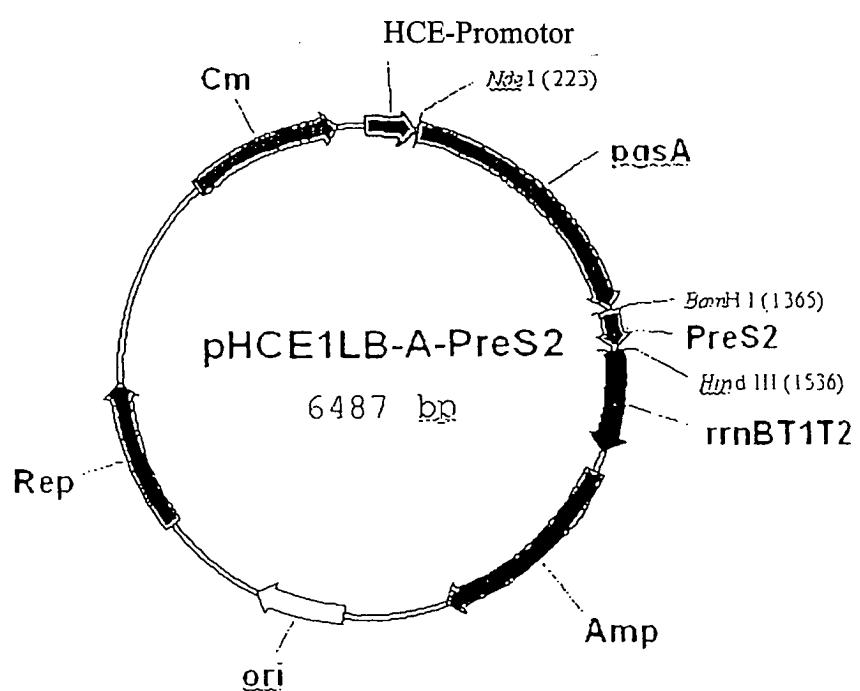
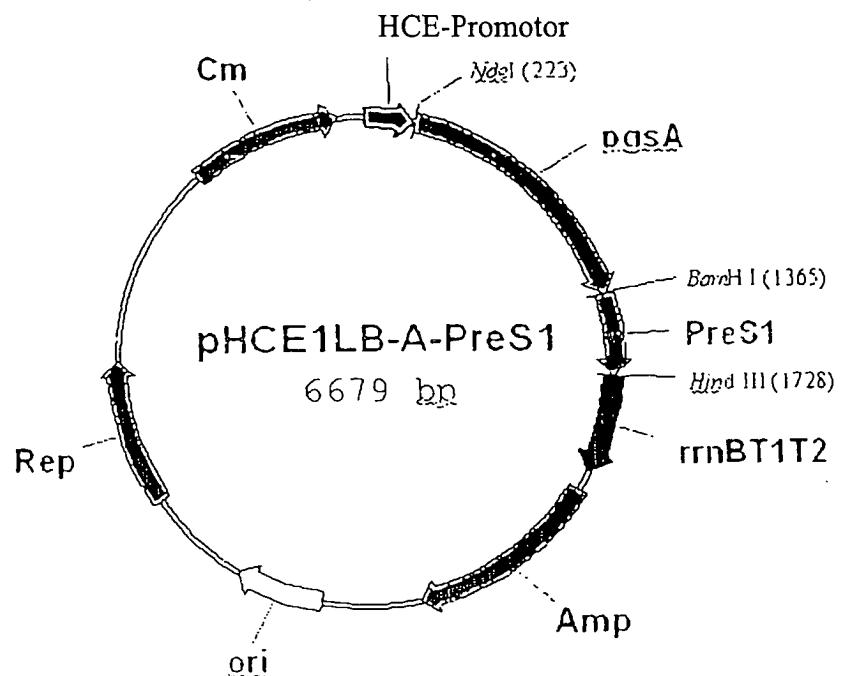


Fig. 18

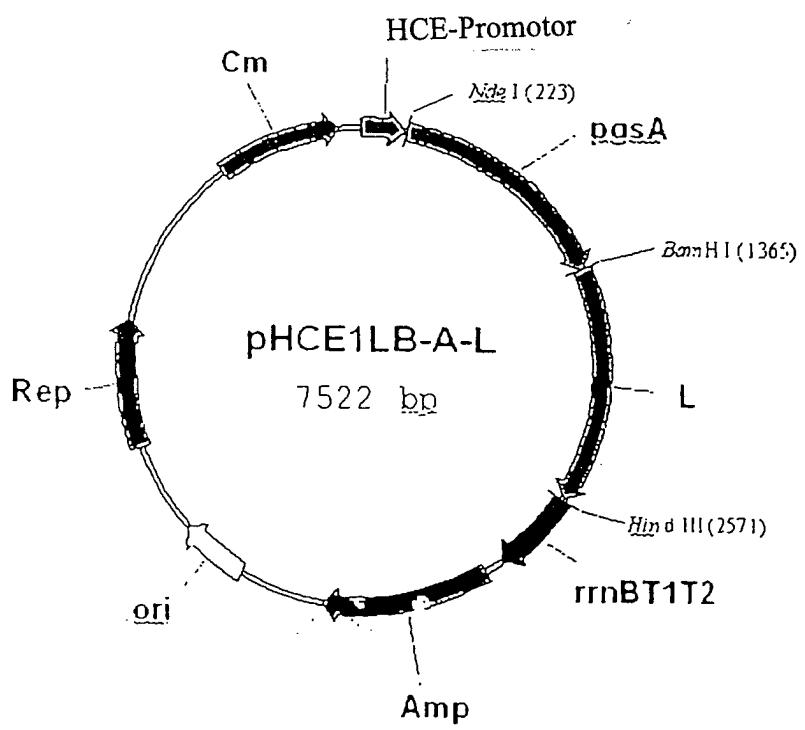
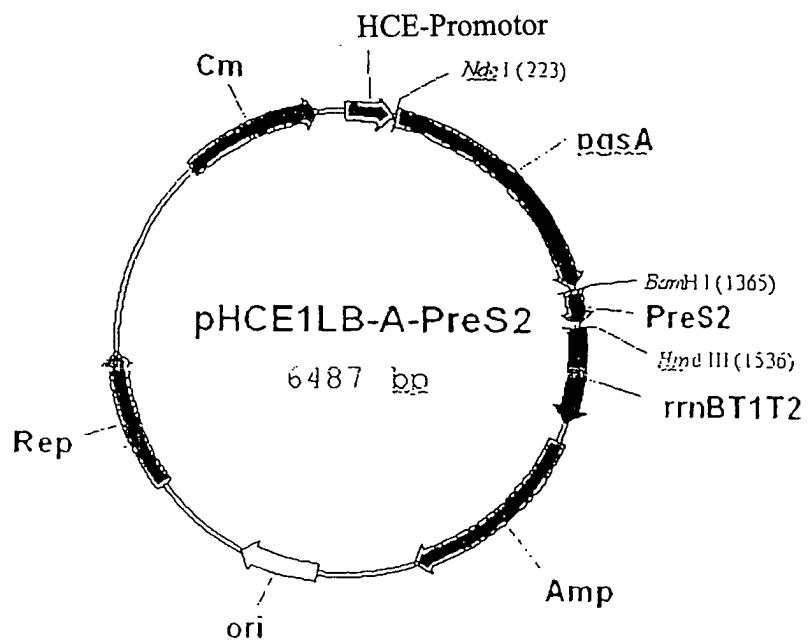


Fig. 19

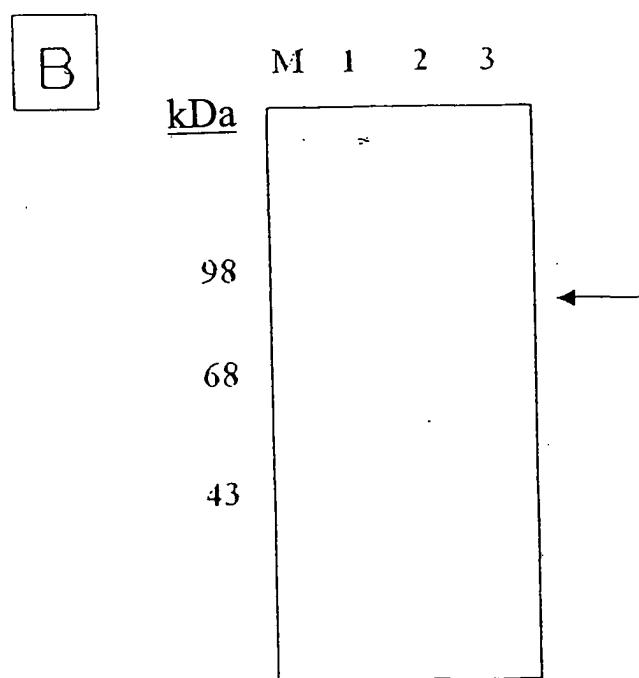
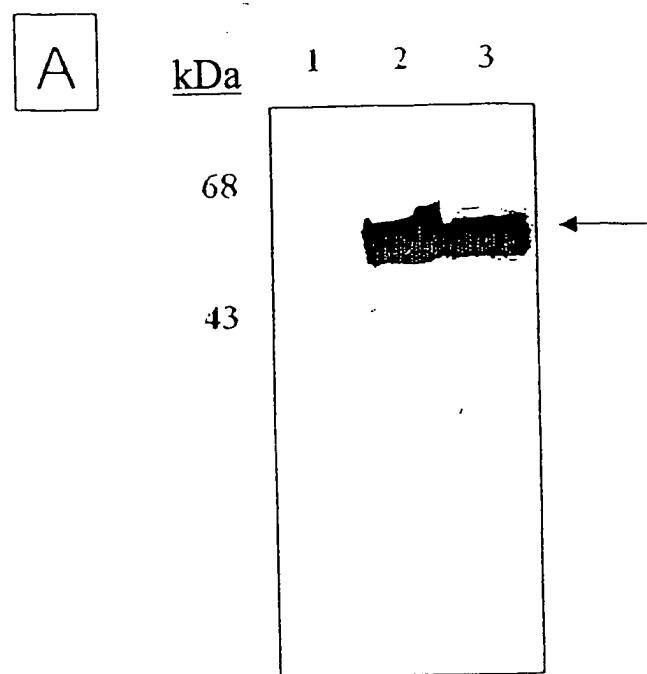


Fig. 20

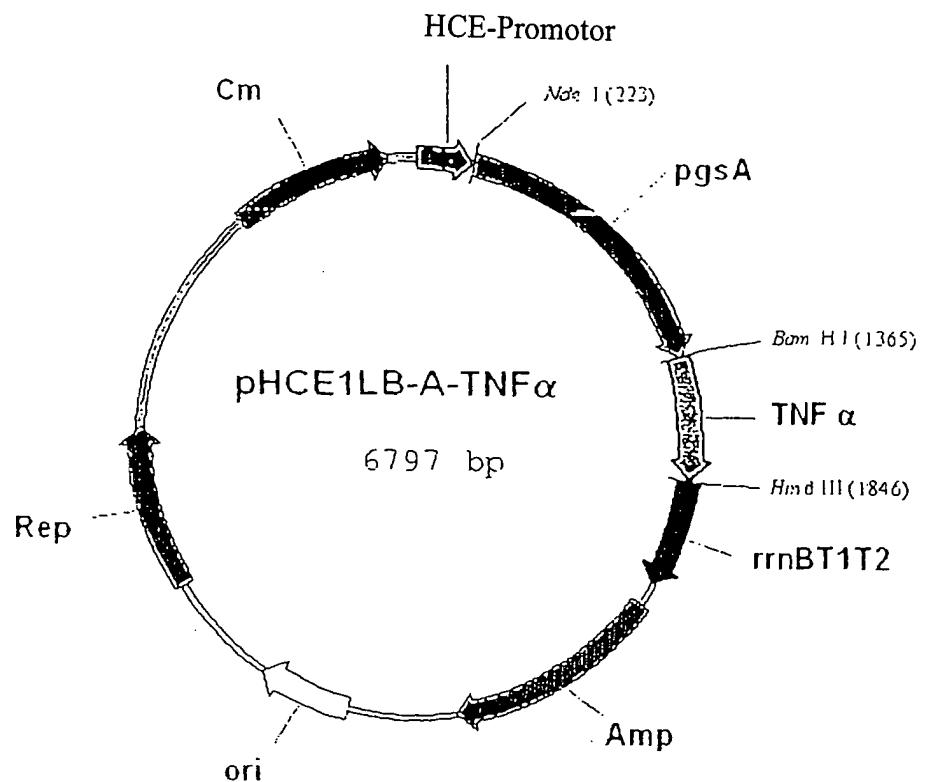


Fig. 21

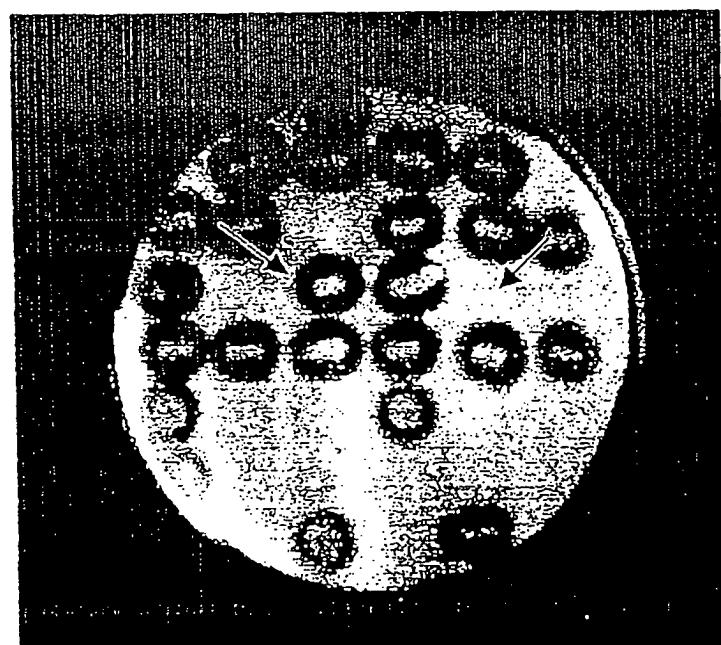
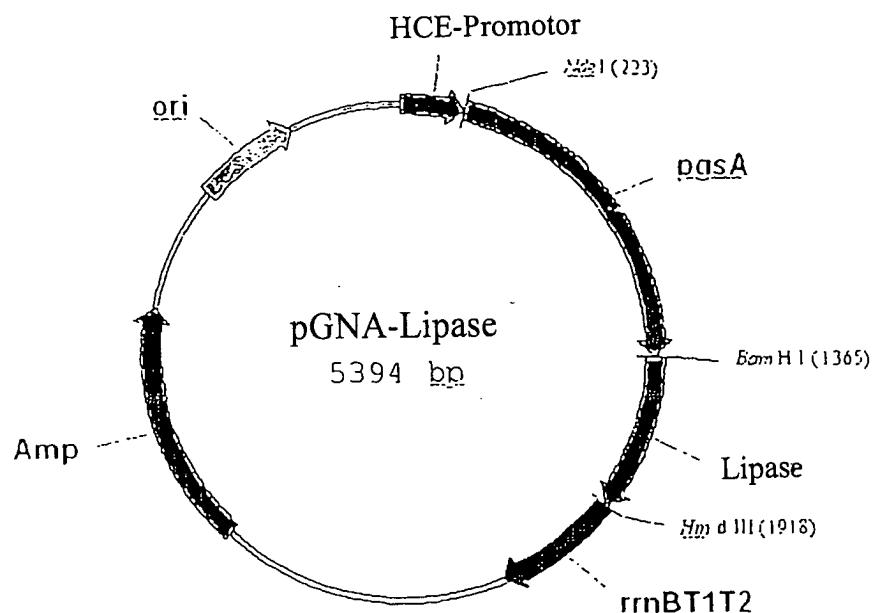


Fig. 22

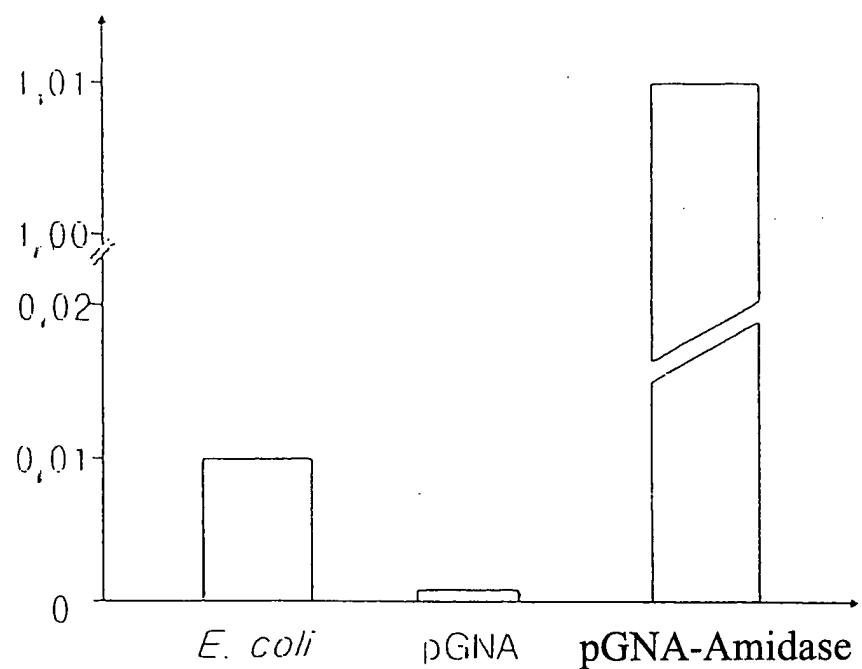
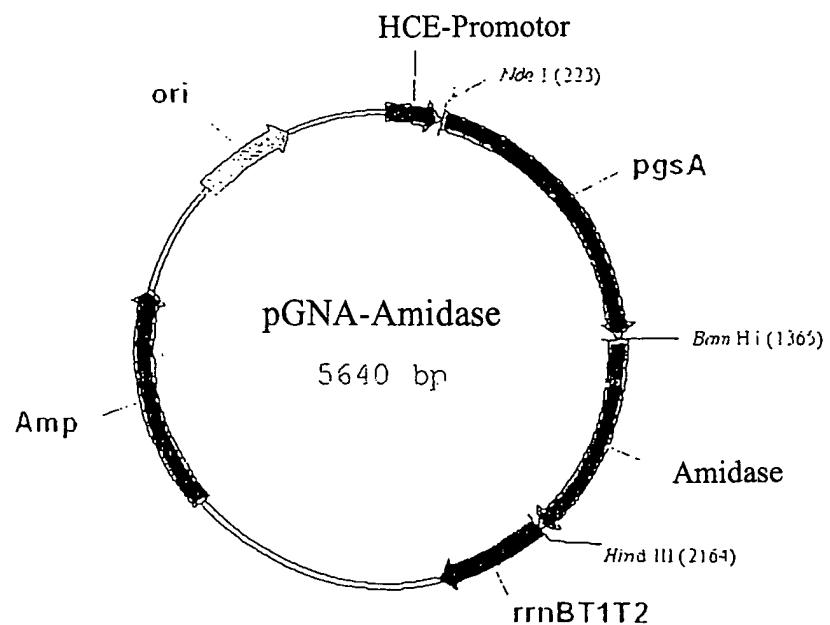


Fig. 23