

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 292 927 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/51
C 12 N 15/66
C 12 N 15/71
C 12 P 21/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 338 994 3	(22)	23.03.90	(44)	14.08.91
(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, O - 1086 Berlin, DE				
(72)	Ulrich, Rainer, Dr. rer. nat., DE; Meisel, Helga, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE; Jantschak, Joachim, Dr. rer. nat. Dipl. Biochem., DE; Rosenthal, Hans Alfred, Prof. Dr. sc. nat., DE; Borisova, Galina, Kandidat der chem. Wiss., SU; Berzins, Ivar, SU; Ozols, Juris, SU; Dischler, Andris, SU; Sominskaja, Irina, SU; Pushko, Peter, SU				
(73)	Humboldt-Universität zu Berlin, Bereich Medizin (Charité), O - 1040 Berlin; Akademie der Lett. SSR, Institut für Organische Synthesen, 226006 Riga, Aizkraukies ul. 21, SU				
(74)	siehe (71)				
(54)	Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Kapsidstruktur HBcAgΔ-preS2/adw, die das Coreantigen des Hepatitis B-Virus mit dem an seiner Oberfläche exponierten Epitop HBVpreS2/adw darstellt				

(55) Kapsid; Coreantigen; Hepatitis B-Virus; preS2-Region; Epitop; rekombinante DNA; Gentechnik; Escherichia coli; Virusdiagnostik; Vakzine

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Kapsidstruktur HBcAgΔ-preS2/adw, die das Coreantigen des Hepatitis B-Virus mit dem an seiner Oberfläche exponierten Epitop HBVpreS2/adw darstellt. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß das Fragment des S-Gens des Hepatitis B-Virus, Subtyp adw, bezeichnet als preS2/adw mit einer Länge von 180 Basenpaaren (Bp) in den Restriktionsort Cla I des Vektorplasmids pHbC 1615 unter Bildung des rekombinanten Gens HBcAgΔ-preS2/adw eingebaut wird. Den Produzentenstamm des HBcAgΔ-preS2/adw erhält man durch Transformation von E. coli K802-Zellen mit rekombinanten Plasmid-DNA pHbV 32-46. Dieser Produzentenstamm ermöglicht die Herstellung der rekombinanten Kapsidstruktur HBcAgΔ-preS2/adw, die das Coreantigen des Hepatitis B-Virus (HBV) mit dem an seiner Oberfläche exponierten Epitop preS2/adw darstellt.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

BAD ORIGINAL

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Kapsidstruktur HBcAg Δ -preS2/adw, die das Coreantigen des Hepatitis B-Virus mit dem an seiner Oberfläche exponierten Epitop HBVpreS2/adw darstellt, **dadurch gekennzeichnet**, daß die 39 C-terminalen Aminosäuren des HBcAg durch die Sequenz des Epitops preS2/adw (4.-55. Aminosäure) und 9 N-terminale Aminosäuren des HBsAg ersetzt sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die rekombinante Plasmid-DNA pHBV 32-46 mit einer Größe von 7080 Bp, bestehend aus
 - der DNA des Plasmids pHbC1615 mit einer Länge von 6900 Bp, die das Gen bla, das die Ampizillin-Resistenz vermittelt, und das HBc-Gen, unter Kontrolle eines Tandempromotors P_{irp}, enthält, und
 - dem Fragment des HBV-Genoms, Subtyp adw, das der Sequenz zwischen den Restriktionsorten Eco RI₀ und Eco 1301₁₈₀ mit einer Länge von 180 Bp entspricht und den Bereich der preS2-Region von der 4. bis zur 55. Aminosäure und die 9 N-terminalen Aminosäuren des HBsAg kodiert und im Restriktionsort ClaI der DNA des Plasmids pHbC1615 eingebaut ist, die Synthese der rekombinanten Kapsidstruktur HBcAg Δ -preS2/adw ermöglicht.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Produzentenstamm des HBcAg Δ -preS2/adw durch Transformation von E. coli K802-Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA pHBV 36-46 erhält.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die rekombinante Kapsidstruktur HBcAg Δ -preS2/adw, die das Coreantigen des Hepatitis B-Virus mit dem an seiner Oberfläche exponierten Epitop HBVpreS2/adw darstellt.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Möglichkeit der effektiven Synthese von Kapsid-ähnlichen rekombinanten Partikeln in E. coli, die das Coreantigen (HBcAg) des humanen Hepatitis B-Virus darstellen (Borisova, G. P., et al. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1984, 279, 1245-1249 Borisova, G. P., et al. Biopolimery i kletka, 1985, 1, 99-105) und an ihrer Oberfläche die komplette Aminosäuresequenz des preS2/Subtyp ayw exponieren, ist gezeigt worden: HBcAg-preS2(2-54) und HBcAg Δ -preS2 (1-55). Die Fusionsproteine enthalten die preS2-Region von der 2. bis zur 54. bzw. von der 1. bis zur 55. Aminosäure. Das Fusionsprotein HBcAg-preS2 (2-54) enthält die vollständige Sequenz des HBcAg, während dem Fusionsprotein HBcAg Δ -preS2 (1-55) die 39 C-terminalen Aminosäuren des HBcAg fehlen. Diese Proteine werden gebildet im Ergebnis der Expression rekombinanter Gene, bei denen die kodierende Sequenz der preS2-Region, ausgeschnitten aus dem klonierten HBV-Genom des Subtyps ayw (Pumpen, P. P., et al. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1981, 260, 1022-1024), in das Kodon für die 144. Aminosäure des HBcAg inseriert ist. Solche Kapsid-ähnlichen Strukturen exponieren an ihrer Oberfläche preS2-Epitope des HBV-Subtyp ayw. Sie besitzen die immunogenen Eigenschaften von preS2-, HBc- und HBs-Antigenen und können in der Diagnostik eingesetzt werden. Außerdem kann das preS2-Antigen HBV-neutralisierende Antikörper induzieren (Neurath, R. S., et al. Science, 1984, 224, 392, Itoh, Y. E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 9174). Somit können solche rekombinanten Proteine als Bestandteile von Diagnostika und/oder Vakzine dienen. Kapside auf der Grundlage des HBcAg, die an ihrer Oberfläche die preS2-Region des HBV-Subtyp adw exponieren, sind bisher nicht beschrieben worden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, rekombinante Kapsidstrukturen mit hoher Immunogenität und großen Ausbeuten herzustellen.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, die Gewinnung rekombinanter Kapsidstrukturen, die das Coreantigen des Hepatitis B-Virus (HBV) mit dem an seiner Oberfläche exponierten Epitop HBVpreS2/adw darstellen, und die Schaffung eines Produzentenstammes für solche Strukturen.

Diese Aufgabenstellung wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß im Ergebnis der Konstruktion des rekombinanten Gens HBcAg Δ -preS2/adw, welches die Synthese des entsprechenden Proteins kodiert, und des Expressionsplasmas pHBV 32-46 ein Produzentenstamm E. coli (pHBV 32-46) erhalten wird, der die Produktion der rekombinanten Kapsidstruktur HBcAg Δ -preS2/adw mit einem Anteil von 13,2% am Gesamtprotein von E. coli sichert.

BAD ORIGINAL

Das rekombinante Plasmid pHBV 32-46, dessen Konstruktionschema in Fig. 1 dargestellt ist, besteht aus folgenden Elementen:

- DNA des Plasmids pHbC 1615, einer Variante des Plasmids pHbC 3, welche das Gen des HBcAg mit einem optimierten Initiationsbereich für die Translation enthält, und ein mutiertes Gen des HBsAg, das einen Polylinker-Einschub im Kodon für die 144. Aminosäure hat, der für den Einbau von Fremdabschnitten in diesem Bereich vorgesehen ist, besitzt; Länge 6900 Bp
- Fragment des HBV-Genoms, Subtyp adw, welches dem Abschnitt zwischen den Restriktionsorten Eco RI₆ und Eco RI₁₀₀ entspricht und den Bereich des preS2 (4. bis 55. Aminosäure) und 9 Aminosäuren des S-Antigens kodiert (Länge 180 Bp). Die Größe des Plasmids beträgt 7080 Bp.

Die DNA des rekombinanten Plasmids pHBV 32-46 enthält die Gene:

- Gen HBcAg Δ -preS2/adw, das die Synthese des Endprodukts gewährleistet,
- Gen bla, welches eine Ampizillin-Resistenz verleiht.

Das Gen HBcAg Δ -preS2/adw steht unter Kontrolle eines Tandempromotors P_{trp}.

Das Plasmid pHBV 32-46 wird nach Zugabe von Chloramphenicol ins Medium nicht-konjugativ amplifiziert.

Das Wesen der Konstruktion des Plasmids pHBV 32-46 besteht darin, daß das Fragment des S-Genes vom HBV, Subtyp adw, bezeichnet als preS2/adw, mit einer Länge von 180 Bp in den Restriktionsort ClaI des Vektorplasmids pHbC 1615 unter Bildung des rekombinanten Gens HBcAg Δ -preS2/adw eingebaut wird.

Den Produzentenstamm des HBcAg Δ -preS2/adw erhält man durch Transformation von E. coli K802-Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA pHBV 32-46.

Morphologische Merkmale: gram-negative stäbchenförmige Zellen, Kulturmerkmale: Zellen wachsen auf üblichen Nährmedien, bilden Kolonien mittlerer Größe.

Physiko-biochemische Merkmale: optische Kultivierungstemperatur 37°C, pH-Optimum 7,0-7,4. Als Kohlenstoffquelle werden Kohlenwasserstoffe, als Stickstoffquelle sowohl Mineralsalze als auch organische Verbindungen in Form von Pepton, Trypton und Aminosäuren eingesetzt.

Antibiotika-Resistenz: resistent gegen Ampizillin, bedingt durch das Vorhandensein des Plasmids. Die Anwesenheit von Plasmid-DNA im Zellstamm wird durch Kontrolle der Ampizillin-Resistenz bestätigt, außerdem durch die Gewinnung und Analyse von Plasmid-DNA.

Der Zellstamm ist in der Kollektion des Zentralmuseums industrieller Mikroorganismen der UdSSR unter der Nummer WKPM W5240 deponiert.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher dargestellt werden.
Die dazugehörigen Abbildungen zeigen

Fig. 1: Konstruktionschema der erfindungsgemäßen rekombinanten Plasmid-DNA pHBV 32-46
Fig. 2: Bestimmung der preS2-Aktivität mittels Immunoblotting.

Die Realisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in 2 Verfahrensschritten:

1. Konstruktion rekombinanter Plasmid-DNA pHBV 32-46

2 µg des Plasmids pHbC 1615, nach Standardmethoden gewonnen, spaltet man mit 2 Einheiten der Restriktase ClaI in 25 µl der Lösung A (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂) 2 Stunden bei 37°C. Die Restriktase inaktiviert man 15 Minuten bei 65°C. Die linearisierte Plasmid-DNA, Länge 6900 Bp, isoliert man aus einem 0,8%igen Agarosegel und resuspendiert sie in 20 µl H₂O (DNA1).

20 µg des Plasmids pAE 10, das das vollständige Genom des HBV-Genoms, Subtyp adw, enthält, spaltet man mit 50 Einheiten der Restriktase Eco RI und 50 Einheiten der Restriktase Eco RI₁₀₀ in 100 µl der Lösung A 16 Stunden bei 37°C. Nach der Inkubation wird das Fragmentgemisch auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und das Fragment mit einer Länge von 180 Bp, welches das Epitop preS2/adw trägt, nach bekannten Methoden aus dem Gel eluiert. Das Fragment wird in 10 µl H₂O resuspendiert (DNA2).

0,05 µg DNA2 und 0,1 µg DNA1 werden gemischt und die überhängenden Enden in 20 µl der Lösung B (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 mM NaCl) durch Zugabe von je 100 µM dATP, dCTP, dTTP und dGTP sowie 5 Einheiten DNA-Polymerase aus E. coli (Klenow-Fragment) im Laufe einer Stunde bei Raumtemperatur aufgefüllt. Die DNAs verbindet man mit Hilfe von 10 Einheiten T₄-DNA-Ligase in 10 µl der Lösung B bei Zugabe von 1 mM ATP im Laufe von 12 Stunden bei 4°C.

Zum Reaktionsgemisch werden 100 µl E. coli RR 1-Zellen, die vorher mit 100 mM CaCl₂ behandelt worden waren (Endkonzentration 5 × 10⁸ Zellen/ml), zugegeben, um die rekombinanten Plasmid-DNAs zu transformieren.

Die Auswahl der Klone erfolgt mit Hilfe der Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA, die im Schnellverfahren isoliert worden war. Das Plasmid mit dem erwarteten Restriktionspaßmuster erhält die Bezeichnung pHBV 32-46. Figur 1 zeigt das Konstruktionschema dieses Plasmids.

2. Transformation des erfindungsgemäßen Plasmids in einen Produzentenstamm

Den Produzentenstamm erhält man durch Transformation von E. coli K802 mit dem rekombinanten Plasmid pHBV 32-46. Die Zellen werden in M9-Medium mit Zusatz von 10 g/l Kasaminsäuren, 2 g/l Glukose und 0,02 g/l Ampizillin bis zu einer optischen Dichte von OD₅₄₀ 4-5 kultiviert. Die Zellen werden durch Zentrifugation gesammelt und im dreifachen Volumen eines Puffers lysiert, der 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,15 M NaCl; 0,1 % Triton X 100; 0,005 M EDTA und 3 mg/ml Lysozym enthält. Nach 30minütiger Inkubation bei 4°C werden die Zellen einem dreimaligen Frieren/Tauen ausgesetzt. Anschließend werden Desoxyribonuklease und MgCl₂ bis zu Endkonzentrationen von 20 µg/ml bzw. 10 mM zugegeben und bei 4°C nochmals 30 Minuten inkubiert. Das Lysat wird 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und dann zentrifugiert (10000 × g, 4°C).

Das rekombinierte Protein HBcAg Δ -preS2/adw wird wie folgt gereinigt:

Das Lysat wird mit Ammoniumsulfat fraktioniert. HBcAg Δ -preS2/adw wird durch 30% Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt. Das Pellet wird gesammelt und in 0,04 M Natriumphosphat, pH 8,0; 0,15 M NaCl; 0,1% Triton X 100 gelöst, bis zu einer Endkonzentration des Proteins von 25–50 mg/ml. 2–4 ml dieser Lösung trägt man auf eine Sepharose CL4B-Säule (2,1 cm $\times$ 75 cm) auf, die mit dem gleichen Puffer (nur ohne Triton X 100) ausgeglichen wurde. Die Fraktionen mit HBcAg-Aktivität (siehe unten) sammelt man und verwendet sie sofort oder nach Konzentrierung durch nochmalige Fällung mit 50% Ammoniumsulfat.

Die Charakterisierung der erfindungsgemäßen rekombinanten Kapsidstruktur wird wie folgt vorgenommen:

Bestimmung der HBcAg-Aktivität mittels radialer Immundiffusion (RID)

Den HBcAg-Titer bestimmt man mit Hilfe der radialen Immundiffusion nach Ouchterlony. Dafür bereitet man eine Verdünnungsreihe (1:2ⁿ, n $\geq$ 1) des Zellysats und titriert gegen anti-HBc-Antikörper des Menschen.

Als Standard verwendet man gereinigtes HBcAg aus rekombinanten Bakterien (1 mg/ml). Die Ergebnisse der Titration sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Synthese von HBcAg Δ -preS2/adw in E. coli K 802-Zellen, die rekombinante Plasmid-DNA pHBV 32–46 tragen

Stamm	OD ₆₅₀	Titer im RID	Protein mg/ml	HBcAg mg/ml	Ertrag des Produkts (%)
E. coli (pHBV 32–46)	4,0	1:128	15,0	2,0	13,2

Bestimmung der preS2-Aktivität mittels Immunoblotting

Für das Immunoblotting resuspendiert man die Zellen (6 mg) in 100 μ l Probenpuffer nach Laemmli, der 2% SDS und 2% Mercaptoethanol enthält, und lysiert durch 2minütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad. Die erhaltenen Lysate (2–4 mg/ml Protein) trägt man auf ein Gradientenpolyacrylamidgel (12–23%) auf (Größe 150 mm $\times$ 150 mm $\times$ 0,75 mm). Die Elektrophorese wird 15 Stunden bei einer Stromstärke von 7 mA durchgeführt.

Nach der Elektrophorese überträgt man die Proteine auf Nitrozellulose HAWP. Die Filter werden mit dem murinen monoklonalen Antikörper MAb E in einer Verdünnung von 1:500 in TBS-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Triton X 100 + 1% BSA) 15 Stunden bei 20°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-Puffer inkubiert man die Filter 2 Stunden bei 20°C mit dem Peroxidase-markierten Konjugat der Antikörper gegen Maus-Immunglobulin (Verdünnung 1:200). Die Filter spült man mit TBS-Puffer (3–5 $\times$) und entwickelt mit Diaminobenzidin.

Die Zellysate des Produzentenstammes weisen dabei das Auftreten spezifischer Färbungszonen auf, welche einem Protein mit einem Molekulargewicht von 21,3 kD (Länge 205 Aminosäuren) entsprechen, was in Übereinstimmung mit dem Konstruktionsschema in Figur 1 steht. Die Kontrolllysate von E. coli K 802-Zellen (pHBc3) weisen solche Zonen nicht auf.

Elektronenmikroskopische Charakterisierung rekombinanter Kapsidstrukturen HBcAg Δ -preS2/adw

Die elektronenmikroskopische Charakterisierung rekombinanter Kapsidstrukturen HBcAg Δ -preS2/adw wird wie folgt vorgenommen:

Die Präparate des gereinigten Proteins HBcAg Δ -preS2/adw (siehe oben) werden mittels Negativ-Kontrastierung unter Verwendung von 1% Uranylacetat gewonnen und im Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und einer 100000fachen Vergrößerung untersucht. Das Protein HBcAg Δ -preS2/adw bildet Kapside mit einem Durchmesser von 25 nm.

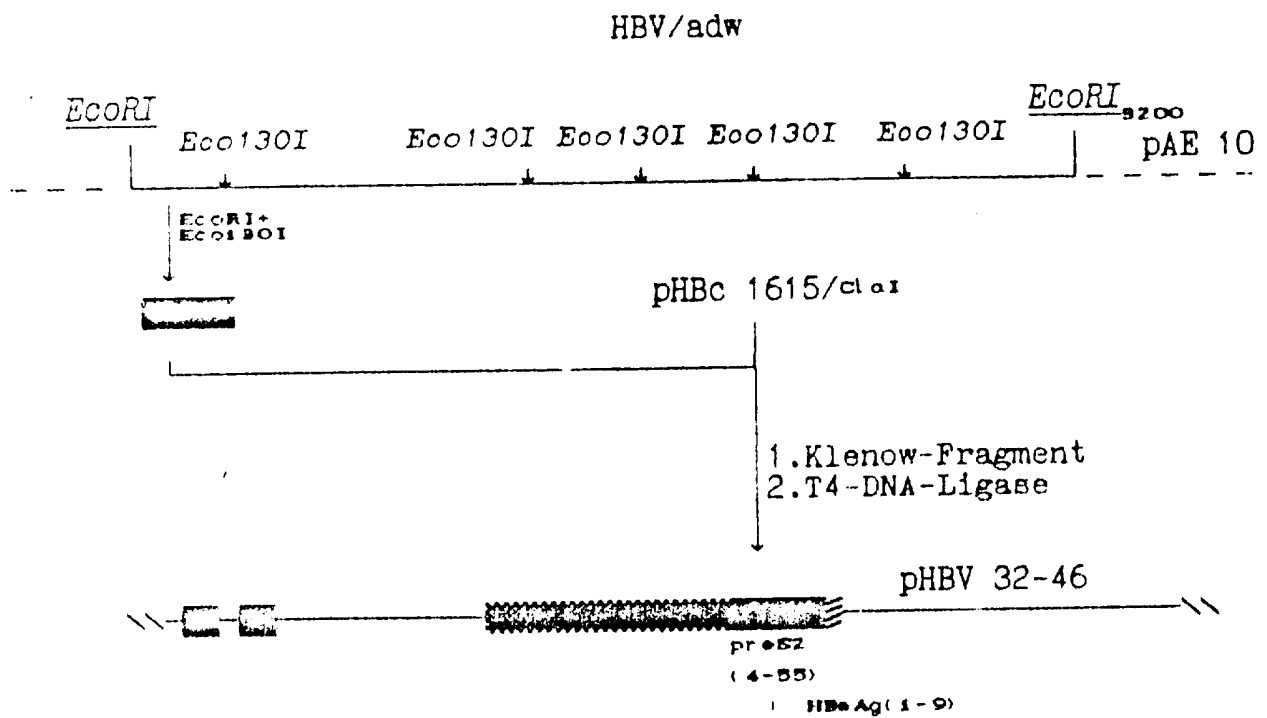


Fig. 1
Konstruktionsschema der erfindungsgemäßen rekombinanten
Plasmid-DNA pHBV 32-46

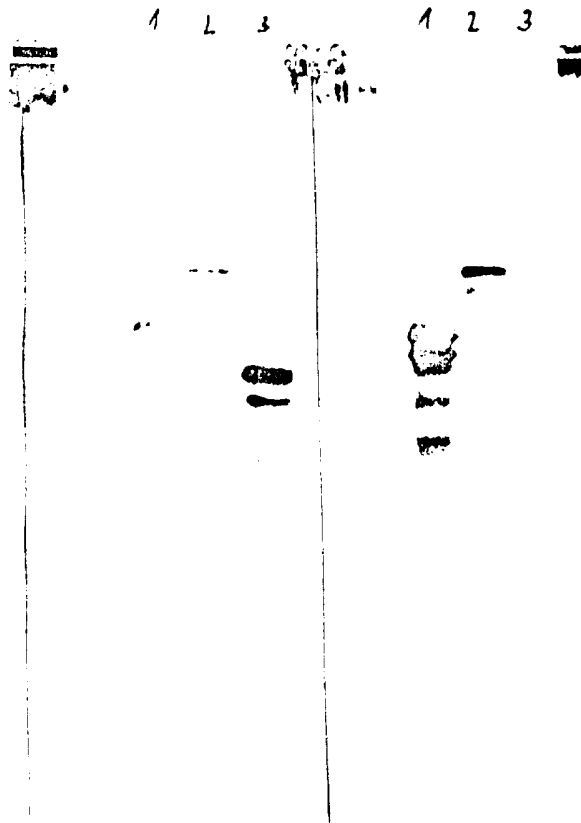


Fig. 2

Bestimmung von proS2- und HBcAg-Aktivität mittels Immunoblotting

links : Nachweis der HBcAg-Aktivität unter Verwendung eines murinen monoklonalen Antikörpers

rechts: Nachweis der proS2-Aktivität unter Verwendung des murinen monoklonalen Antikörpers MAb E

Bahnen (von links nach rechts):

- 1) E. coli K902 (pHDV 32-4G)
- 2) E. coli K802 (Plasmid, das eine Fusion proS2/oyw-HBcAg trägt)
- 3) E. coli K802 (pHDc 3)