



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Patentschrift  
10 DE 31 12 338 C 2

61 Int. Cl.º:  
C 12 N 15/51

- 21 Aktenzeichen: P 31 12 338.4-41
- 22 Anmeldetag: 28. 3. 81
- 43 Offenlegungstag: 7. 10. 82
- 45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 23. 2. 95

DE 31 12 338 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

- 73 Patentinhaber:  
Helm, Klaus von der, 82110 Germering, DE;  
Winnacker, Ernst-L., 80636 München, DE; Deinhardt,  
Friedrich, 81545 München, DE
- 74 Vertreter:  
von Kreisler, A., Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 50667 Köln

- 72 Erfinder:  
gleich Patentinhaber
- 66 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 1,  
S. 15-36, 1979;  
Infection and Immunity, S. 898-908, 1976;  
Nature, Vol. 289, S. 555-559, 12. Feb. 1981;  
J. of Virology, S. 473-477, Jan. 1981;

54 Verwendung von Hybridisierungssonden zum Nachweis von HAV

DE 31 12 338 C 2

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hybridisierungssonden, erhältlich dadurch, daß man

- a) cDNA durch reverse Transkription der viralen RNA des HAV herstellt und in ein Escherichia-coli-Plasmid kloniert;
- b) ein Bakterium mit diesem Escherichia-coli-Plasmid transformiert;
- c) HAV-positive Klone selektiert, indem man diejenigen Klone auswählt, die im Vergleich zum negativen Testhintergrund 2—3fach so stark in einem Radioimmuntest reagieren, zum Nachweis von HAV.

Hepatitis A (HA) bleibt eine Krankheit, die im Rahmen der öffentlichen Gesundheit von großer Bedeutung ist, und ihr Verursacher wurde erst kürzlich identifiziert. Die Arbeitsausfälle sind lang, die Krankenkosten (durch z. B. Isolierung des Kranken) hoch. Eine passive, besser noch allgemeine aktive Impfung wäre von großem gesundheitspolitischem und volkswirtschaftlichem Nutzen. Dazu müßte der Erreger dieser Krankheit, das Hepatitis-A-Virus (HAV) in großer Menge zur Verfügung stehen um a) wissenschaftliche Studien zu treiben, b) das virale Antigen zur Immunisierung benutzen zu können. Das ist augenblicklich nicht der Fall. Virusmaterial steht noch nicht einmal in solcher Menge zur Verfügung, daß eine ausreichende biochemisch-virologische Untersuchung des Viruspartikels durchgeführt werden kann.

Hepatitis A wurde 1967—1970 erstmals auf nicht-menschliche Primaten übertragen (ein Überblick wurde von Deinhardt, F., 1976, in "Advances in Virus Research, Vol. 20, Herausgeber F.B. Bang (Academic Press, New York), S. 113, gegeben), und Viruspartikel wurden später im Stuhl von in der akuten Phase befindlichen Patienten durch Immunelektronenmikroskopie von Feinstone et al 1973 identifiziert (Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian und R.H. Purcell, Science 182 (1973) 1026).

Die biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften des Hepatitis-A-Virus (HAV) wurden von Provost et al (P.H. Provost, B.S. Wolanski, W.J. Milier, O.L. Ittensohn, W.J. McAleer und M.R. Hilleman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148 (1975) 532), Siegl und Frösner (G. Siegl und G.G. Frösner, J. Virol. 26 (1978) 40 und 48), Coulepis et al (A.G. Coulepis, S.A. Locarnini, A.A. Ferris, N.I. Lehmann und I.D. Gust, Intervirology 10 (1978) 24 und A.G. Coulepis, S.A. Locarnini und I.D. Gust, J. Virol. 35 (1980) 572), Bradley et al (D.W. Bradley, C.L. Hornbeck, E.H. Cook und J.E. Maynard, J. Virol. 22 (1978) 228 und D.W. Bradley, H.A. Fields, R.A. McCaustland, E.R. Cook, C.R. Gravelle und J.E. Maynard, J. Med. Virol. 2 (1978) 175), Feinstone et al (S.M. Feinstone, Y. Moritsugu, J.W.K. Shih, J.L. Gerin und R.H. Purcell in "Viral Hepatitis", herausgegeben von G.N. Vyas, S.N. Cohen und R. Schmidt (Abacus Press, Turnbridge Wells) 1979, S. 41), Maynard und Bradley (J.E. Maynard und D.W. Bradley (1980) in "Virus and the Liver", herausgegeben von L. Bianchi, W. Gerock, K. Sickinger und A. Stadler (MTP Press Ltd., Lancaster) S. 9) und Tratschin et al (J.D. Tratschin, G. Siegl, G.G. Frösner und F. Deinhardt, 1981, J. Virol., im Druck) bestimmt, und es besteht nun allgemeine Übereinstimmung, daß HAV ein Picornavirus mit den meisten Charakteristiken eines Enterovirus ist.

Aus J. of Virology, Seiten 473—477 (1981) ist bekannt, daß das Genom von HAV eine einsträngige lineare RNA ist. Diese RNA (wahrscheinlich mit Poly-A-Regio-

nen am 3'-Ende) weist eine Größe von 2,25 bis  $2,8 \times 10^6$  Dalton und einem Sedimentationskoeffizienten von 32,5 bis 33 S im Vergleich zu Poliovirus, das etwa 6500 Nucleotiden entspricht, auf. Die Genkarte von HAV und die Expression der Gene sind unbekannt. Über die Struktur der Genprodukte der HAV-Proteine und ihre Antigenizität ist wenig bekannt.

Lediglich von Maul- und Klauenseuchevirus wurde berichtet, daß eine doppelsträngige DNA-Kopie der genomischen Virus-RNA in das E. coli-Plasmid pBR322 kloniert und in E. coli exprimiert werden kann (Nature, Vol. 289, pp. 555—559 (1981)).

Eine Diskussion von Techniken zur Herstellung und Klonierung von ds-DNA aus eukaryotischer mRNA findet sich in Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 1, 15—36 (1979).

Obwohl HAV kürzlich in Zellkulturen gezüchtet worden ist (P.H. Provost und M.R. Hilleman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160 (1979) 231; G.G. Frösner, F. Deinhardt, R. Scheid, V. Gauss-Müller, N. Holmes, V. Messelberger, G. Siegl und J.J. Alexander, Infection 7 (1979) 303; B. Flehmig, Münch. med. Wschr. 119 (1977) 825 und F. Deinhardt, R. Scheid, V. Gauss-Müller, G.G. Frösner und G. Siegl, Progr. Med. Virol. 27 (1981) im Druck, zeigen infizierte Zellen keinen cytopathischen Effekt (CPE), d. h. sie werden durch die Virusinfektion nicht abgetötet und Viruspartikel werden nicht freigegeben. Jedoch ist der Wachstumszeitraum in der Gewebekultur ungewöhnlich lang, die Ausbeute relativ gering und stark durch die Tatsache behindert, daß das Virus nicht von den Kulturzellen freigesetzt wird, sondern durch künstliche Zerstörung dieser Zellen gewonnen werden muß, wobei die Gefahr der Kontamination von zellulärem Material außergewöhnlich hoch ist. Die Reinigung von HAV aus solchen Kulturen ist kompliziert, weil infizierte Zellen lysiert und HAV von den Zelltrümmern abgetrennt werden muß. Darüberhinaus ist in Infection and Immunity, 898—908 (1976) aus Faeces gewonnenes Hepatitis-A-Antigen offenbart.

Aufgrund der dargestellten Schwierigkeiten wurde die Entwicklung des Nachweisverfahrens für HAV bisher sehr behindert.

Die Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, ein geeignetes Nachweisverfahren für HAV bereitzustellen.

Diese und andere Aufgaben, die sich aus der nachfolgenden Beschreibung ergeben, werden durch die Erfindung gelöst.

Dementsprechend betrifft die Erfindung die Verwendung von Hybridisierungssonden, erhältlich dadurch, daß man

- a) cDNA durch reverse Transkription der viralen RNA des HAV herstellt und in ein Escherichia-coli-Plasmid kloniert;
- b) ein Bakterium mit diesem Escherichia-coli-Plasmid transformiert;
- c) HAV-positive Klone selektiert, indem man diejenigen Klone auswählt, die im Vergleich zum negativen Testhintergrund 2—3fach so stark in einem Radioimmuntest reagieren, zum Nachweis von HAV.

Gemäß der Erfindung wird das HAV-Genom in Form einer komplementär DNA (= cDNA) in ein Bakterienplasmid kloniert (eingebaut), die Bakterienklone werden gezüchtet, das Genom wird repliziert und einzelne Gene werden exprimiert, so daß vollständige oder teilweise Produktion von viralen Proteinen erfolgt, die HAV-spezifische Antigenizität aufweisen. Dabei wird wie folgt

verfahren:

Vom Stuhl entnommenes Hepatitis-A-Virus (HAV) wurde stark gereinigt. Die genomische RNA wurde zu cDNA mittels der AMV-reversen Transcriptase transkribiert, und diese DNA wurde dann in den Pst I-Ort des Plasmid pBR 322 kloniert, und Klone wurden in Gegenwart von Tetracyclin selektiert. Die meisten Klone enthielten Einfügungen im Plasmid, die mit HAV-spezifischer RNA hybridisieren, die von HAV-infizierten Zellkulturen isoliert worden war, die von einem menschlichen hepatocellulären Karzinom stammten. Einige Klone zeigten Expression unterschiedlicher Mengen viraler Antigene, die verwendet werden kann zur Immunisierung gegen HAV.

Der Vorteil dieser Methode ist die fast unbegrenzt herstellbare Menge von viralem Material, die als Bakteriensuspension in großindustriellem Maßstab erfolgen kann. Weiter liegt der Vorteil in der Möglichkeit, gezielt nur dasjenige Virusmaterial, d. h. die viralen Antigenproteine, herstellen zu können, die zum Immunitätsprozeß benötigt werden, nicht aber anderes Virusmaterial, das als Ballast kostenaufwendig ist. Vor allem wird bei dieser Methode des Klonierens vermieden, infektiöses Material (Virusgenom) mit herzustellen, das unter großem Aufwand wieder entfernt oder weggereinigt werden müßte. Die genetische Information für die viralen Antigene bleibt in dem Bakterium verankert, die Bakterien produzieren nur das Immunmaterial.

Die im Patentanspruch genannte Hybrid-DNA kann auf verschiedenen Gebieten verwendet werden. Damit kann man damit routinemäßig das Vorhandensein von HAV in klinischem Material nachweisen, wobei dazu diese Hybrid-DNA-Moleküle verwendet werden, die nach bekannten Verfahren radioaktiv markiert worden sind.

Die Erfindung wird nachstehend weiter anhand der Abbildungen erläutert.

Fig. 1 : Größe der eingefügten DNA

Einzelne Bakterienklone wurden gezüchtet und Plasmide hergestellt. Die Größe der Plasmide wurde durch Elektrophorese auf 1%igem Agarosegel ermittelt und Banden durch Ethidiumbromid in UV-Licht sichtbar gemacht. Die Aufnahmen b und c zeigen zwei typische Plasmide mit DNA-Einfügung, und die Aufnahmen a und d stellen das Bezugsplasmid pBR 322 ohne Einfügung dar.

Fig. 2: Hybridisierung von Plasmid-Einfügungen mit <sup>32</sup>P-markierter HAV-RNA

Klone wurden auf Nitrocellulosefiltern über Agar gemäß Grunstein und Hogness (loc.cit.) gezüchtet. HAV-spezifische RNA, gewonnen von mit HAV infizierten PLC/PRF5-Zellen (Alexander et al, 1978, loc.cit.) und mit <sup>32</sup>P markiert, wurde zu den auf Nitrocellulosefiltern gezüchteten Bakterienklonen hybridisiert. A) Autoradiogramm von drei Filtern mit gewachsenen Klonen nach Hybridisierung mit HAV-spezifischer RNA; B) schematische Darstellung dieser drei Filter. (die Pfeile unten rechts stellen Kontrollkolonien dar, die pBR 322-DNA ohne Einfügung enthalten); Klone ● = Hybridisierung positiv; Klone ○ = Hybridisierung negativ.

Fig. 3

Wasserschok-Lysate verschiedener Mengen von aliquoten Teilen einzelner Bakterienklone wurden einem HAV-Radioimmunttest unterworfen. A) Radioimmunttests mit Kugeln, die mit Anti-HAV-positivem menschlichen Serum umhüllt sind; B) mit Kugeln, die mit Anti-HAV-negativem menschlichen Serum umhüllt sind.

Für die Untersuchung wurden HAV-Partikel aus einem Stuhl hergestellt, der von einem Patienten, bei dem sich vier Tage später typische Hepatitis A einstellte, erhalten worden war. Die Gesamtausbeute an Partikeln entsprach ungefähr einer Virusmasse von etwa 10 bis 20 µg. Aus den Partikeln extrahierte RNA wurde mit reverser Transcriptase des Myeloblastosis-Virus von Vögeln (AMV) in cDNA transkribiert, und die Analyse der cDNA durch Gel-Elektrophorese ergab eine ungefähr Ausbeute von 10 bis 50 ng DNA von einheitlicher Größe mit der überwiegenden Population bei etwa 800 bis 1000 Basenpaaren. Die DNA wurde in den Pst I-Restriktionsort des Plasmids pBR 322 kloniert. E. coli X 1776 wurde dann durch die Hybridplasmide transformiert, und Klone wurden in Gegenwart von Tetracyclin selektiert. Aus einzelnen Bakterienklonen wurden Plasmide hergestellt. Die Analyse der klonierten Plasmide ergab, daß viele eine DNA-Einfügung (Fig. 1) im Bereich von 300 bis 800 Nucleotiden enthielten.

Um zu ermitteln, ob die DNA-Einfügung HAV-spezifische Nucleotidsequenzen aufwies, wurden die rekombinierten Plasmide zu HAV-spezifischer, mit <sup>32</sup>P markierter RNA hybridisiert. Diese RNA-Proben wurden aus einer anderen Quelle hergestellt, nämlich aus mit HAV infizierten Zellkulturen, um falsche Ergebnisse als Folge einer Kontamination mit nicht-viraler RNA der für die Transkription verwendeten ursprünglichen, vom Stuhl gewonnenen viralen RNA zu vermeiden. Die meisten Klone, die Einfügungen enthielten, hybridisierten zu dieser HAV-RNA (Fig. 2).

Die Bakterienklone wurden auf Expression von Antigen nach Wasserschok-Lysis der Bakterien (Villa-Komaroff et al, loc.cit.) untersucht, und die Schockfluids wurden in einem Festphasen-Radioimmunttest (HAVAB von Abbott Laboratories, North Chicago, USA) auf HAV-Antigene getestet. Zwei Klone waren positiv, d. h. sie reagierten auf einem 2- bis 3fachen Niveau über dem negativen Hintergrund. Steigende Mengen von Schockfluids (2,20 bzw. 200 ml) banden proportional steigende Mengen von Radioaktivität beim Radioimmunttest (Fig. 3A).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Radioimmunttest unter Verwendung einer festen Phase (Kugeln) durchgeführt, die mit HAV-negativem Serum umhüllt worden waren. Fig. 33 zeigt, daß kein Schockfluid unter diesen Bedingungen reagierte, ein weiterer Beweis, daß HAV-spezifische Polypeptide in den Klonen 22 und 29 exprimiert sind.

Die vorhandenen Klone können nunmehr als Hybridisierungssonden und Primer für die Herstellung von weiterer cDNA unter Verwendung von RNA von mit HAV infizierten Zellkulturen verwendet werden.

#### Reinigung von Viruspartikeln

HAV-Partikel wurden aus 25 g gefrorenem Stuhl gereinigt wie beschrieben (G. Siegl und G.G. Frösner, J. Virol. 26 (1978) 40 und 48). Die Partikel wurden, kurz gesagt, aus dem Stuhl entnommen, an einem vorgebildeten CsCl-Dichtegradienten (Dichte 1,25–1,50 g/cm<sup>3</sup>,

mittl. Dichte  $1,35 \text{ g/cm}^3$ ), der oben ein Kissen von 30%iger Saccharose zur Absorption des größten Teils der nicht-verwandten Proteine trug, gebandet, und die Fraktion mit einer Dichte von  $1,34 \text{ g/cm}^3$  wurde durch Sedimentationszentrifugation über einen Saccharosegradienten gebandet. HAV-Antigen-positive Fraktionen, getestet mit dem Standard-Radioimmunttest der Feststoffphase, G.G. Frösner, Münch. med. Wschr. 119 (1977) 825 unter Verwendung von HAVAB-Test-Kits der Abbott Laboratories, North Chicago) wurden zusammengegossen und dann erneut mit einem CsCl-Dichtegradienten ähnlich wie oben gebandet. Die Gesamtausbeute von Partikeln aus dieser Zentrifugation band  $10^7$  cpm von mit  $^{125}\text{I}$  markiertem Ahti-HAV. Dies entspricht ungefähr einer Virusmasse von etwa 10 bis 20  $\mu\text{g}$ .

#### Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

RNA wurde aus den Partikeln nach der Guanidin-Rhodanid-Methode extrahiert (A. Ullrich, J. Shine, R. Chirgivin, E. Pictet, W.J. Rutter und H.M. Goodman, Science 196 (1977) 1313), so daß sichergestellt wurde, daß keine RNase-Aktivität vorhanden war. Sie wurde mit 100 U reverser Transcriptase des Myeloblastosis-Virus von Vögeln (Boehringer Mannheim) in Gegenwart von Oligo-d-T<sub>12-18</sub> als Primer, 8 mM MgAc<sub>2</sub>, 0,01% NP-40®, Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxyguanidintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP) je 1 mM, 0,2 mM Desoxycytidintriphosphat (dCTP) und 0,5 mCi  $^{32}\text{P}$ -dCTP als radioaktiver Nucleotidvorstufe (NEN) 2 Stunden bei 42°C transkribiert. Das gesamte Inkubationsgemisch wurde 1 Minute bei 80°C erhitzt und schnell gekühlt, worauf erneut zur Doppelstrang-Synthese 50 U reverse Transcriptase zugesetzt wurden und das Gemisch 2 Stunden bei 30°C inkubiert wurde. Die Analyse der komplementär-DNA (cDNA) durch Gelelektrophorese ergab eine ungefähre Ausbeute von 10–50 ng DNA einer uneinheitlichen Größe zwischen einigen Hundert bis zu 2000 Basenpaaren, wobei die größere Population bei etwa 800 bis 1000 Basenpaaren lag.

#### Klonieren von cDNA in Plasmide

An die DNA wurde das Desoxycytidin am 3'-Ende (T. Nelson und D. Brutlag, Methods of Enzymology 68 (1979) 41, herausgegeben von R. Wu (Academic Press New York)) unter Verwendung von terminaler Transferase (P-L. Biochemicals Inc., Milwaukee) angehängt und dann mit Plasmid-pBR 322-DNA hybridisiert, die mit den Restriktionsenzymen PstI durchschnitten worden war, und an deren 3'-Enden Desoxyguanidin (dG)-Homopolymere angehängt worden waren (Nelson und Brutlag, loc. cit.). E. coli X 1776 wurde dann mit den Hybrid-Plasmiden transformiert und Klone wurden in L-Nährmedium in Gegenwart von Tetracyclin ( $12 \mu\text{g/cm}^3$ ) selektiert (H.M. Goodman und R.J. MacDonald, Methods of Enzymology 68 (1979) 75, Herausgeber R. Wu (Academic Press, New York)).

#### Analyse von Plasmid-Einfügungen

Einzelne bakterielle Klone wurden bis zu 100 ml in Gegenwart von Urudin gemäß M.V. Norgard, K. Emingholz und J. Monahan (J.Bact. 138 (1979), 270) gezüchtet und Plasmide wurden durch Lysis mit Triton X-100® und anschließende CsCl-Sedimentationszentrifugation in

Gegenwart von Ethidiumbromid hergestellt (Villa-Komaroff, L., A. Efstradiadis, S. Broome, P. Lomedico, R. Tizard, S.P. Naber, W.L. Chick und W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), 3727 und F. Bolivar und K. Backman, Methods of Enzymology 68 (1979) 245, Herausgeber R. Wu (Academic Press, New York)). Die Größe der Plasmide wurde durch Elektrophorese an 1%igem Agarosegel analysiert, und die Banden wurden mit Plasmid-Markern mit DNA-Einfügungen von bekannter Größe verglichen.

#### Hybridisierung von HAV-RNA zu Plasmid-DNA

Einzelne Bakterienklone wurden auf Nitrocellulose-Filtern über Agar gemäß M. Grundstein und D.S. Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 3961) gezüchtet. HAV-spezifische RNA wurde von den mit HAV infizierten PLC/PRF5-Zellen gewonnen (J. Alexander, G. Macnab, R. Saunders, Perspectives in Virology 10 (1978) 103 (Herausgeber M. Pollard (Raven Press, New York)). Vier Wochen nach der Infektion mit HAV (Frösner et al, 1979, loc.cit.; Deinhardt et al, 1981, loc.cit.), wurde den Zellen das Phosphat für 12 Std. entzogen, worauf sie mit  $^{32}\text{PO}_4$  (NEN;  $1 \text{ ci/cm}^3$ , trägerfrei 24 Std. lang markiert und lysiert wurden. Die HAV-Partikel wurden durch CsCl-Sedimentationszentrifugation gereinigt. Eine Bande mit der Dichte von HAV ( $1,34 \text{ g/cm}^3$ ), die bei einem HAV-Radioimmunttest eine positive Reaktion zeigte, wurde mit Phenol behandelt, und die RNA ( $100\,000 \text{ cpm/Filter}$ ) wurde in 50%igem Formamid,  $5 \times \text{SSC}$  bei 40°C für 15 Stunden zu den auf Nitrocellulosefiltern gezüchteten Bakterienklonen hybridisiert. Jedes Filter enthielt einen negativen Kontrollklon mit dem Plasmid pBR 322, der keine Einfügung hatte.

#### Expression von HAV-Antigen

Einzelne Bakterienklone wurden in jeweils 250 ml Suspension bis zu einer optischen Dichte (O.D.) von 0,8 gezüchtet, worauf aliquote Teile von je 2, 20 und 200 ml zentrifugiert wurden. Die Bakterien-Pellets wurden mit Wasser gemäß Villa-Komaroff et al (1978, loc.cit.) lysiert, und aliquote Teile von 300  $\mu\text{l}$  jedes Wasserschokfluids wurden auf HAV-Antigene in einem Festphasen-HAV-Radioimmunttest (siehe oben) untersucht. Als Kontrolle wurden die beim Radioimmunttest verwendeten Polystyrolkugeln mit Anti-HAV Negativserum umhüllt.

#### Patentanspruch

Verwendung von Hybridisierungssonden, erhältlich dadurch, daß man

- a) cDNA durch reverse Transkription der viralen RNA des HAV herstellt und in ein Escherichia-coli-Plasmid kloniert;
- b) ein Bakterium mit diesem Escherichia-coli-Plasmid transformiert;
- c) HAV-positive Klone selektiert, indem man diejenigen Klone auswählt, die im Vergleich zum negativen Testhintergrund 2–3fach so stark in einem Radioimmunttest reagieren, zum Nachweis von HAV.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

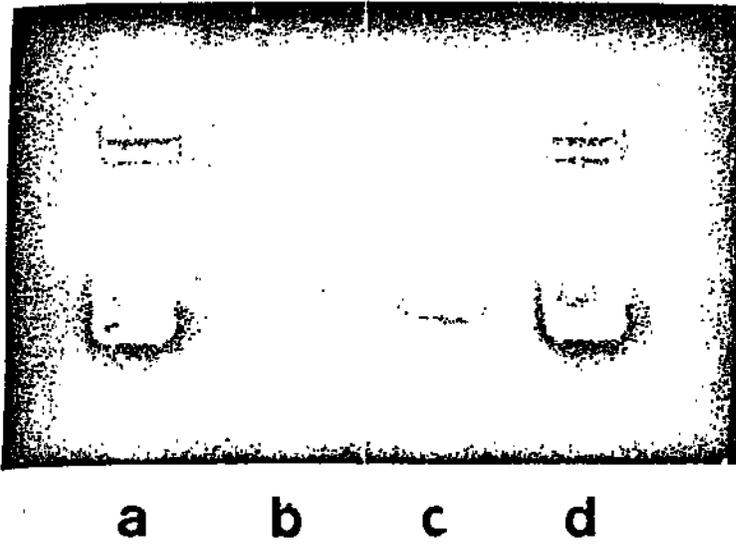
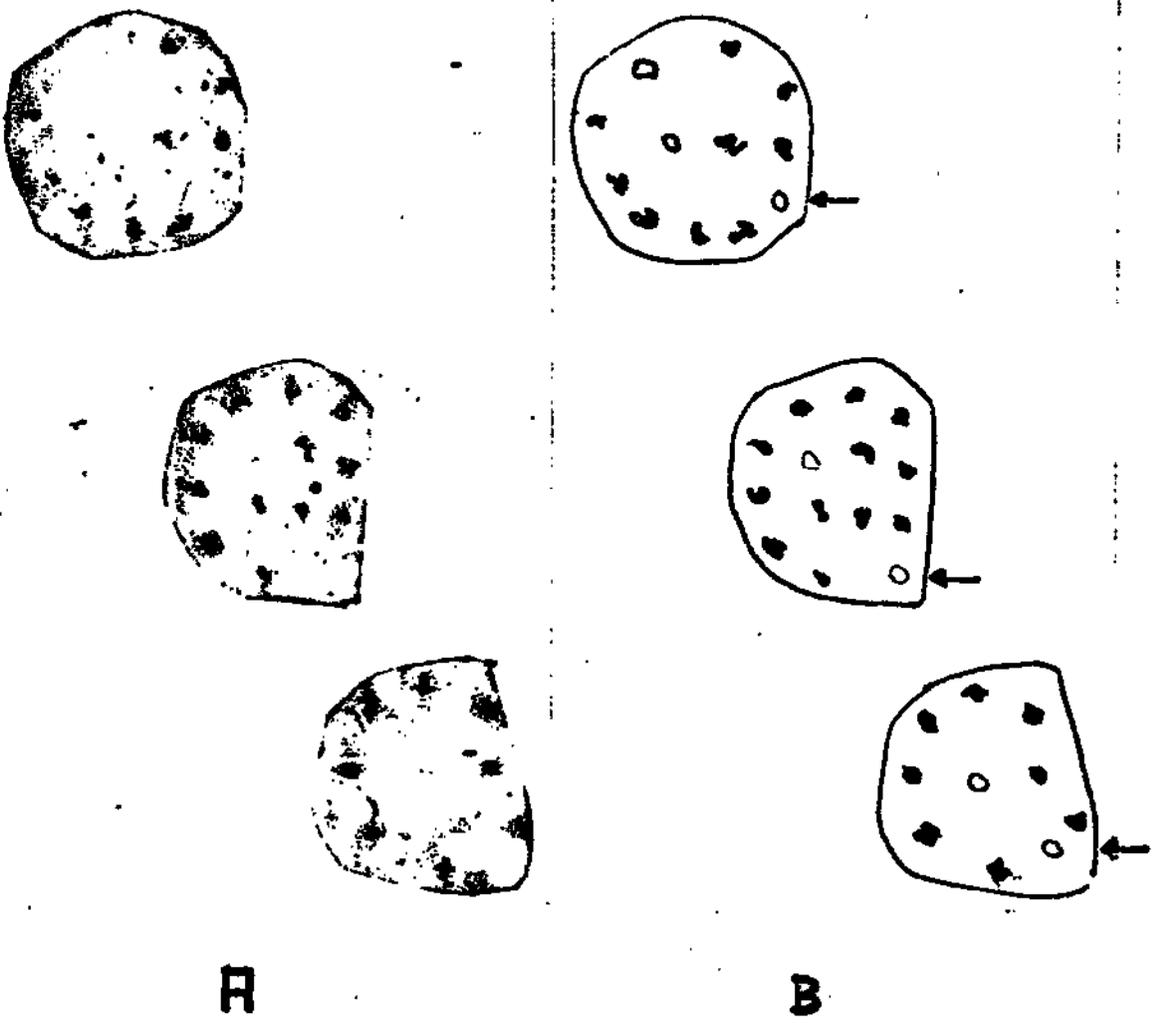


Fig 1



**A**

**B**

Fig. 2

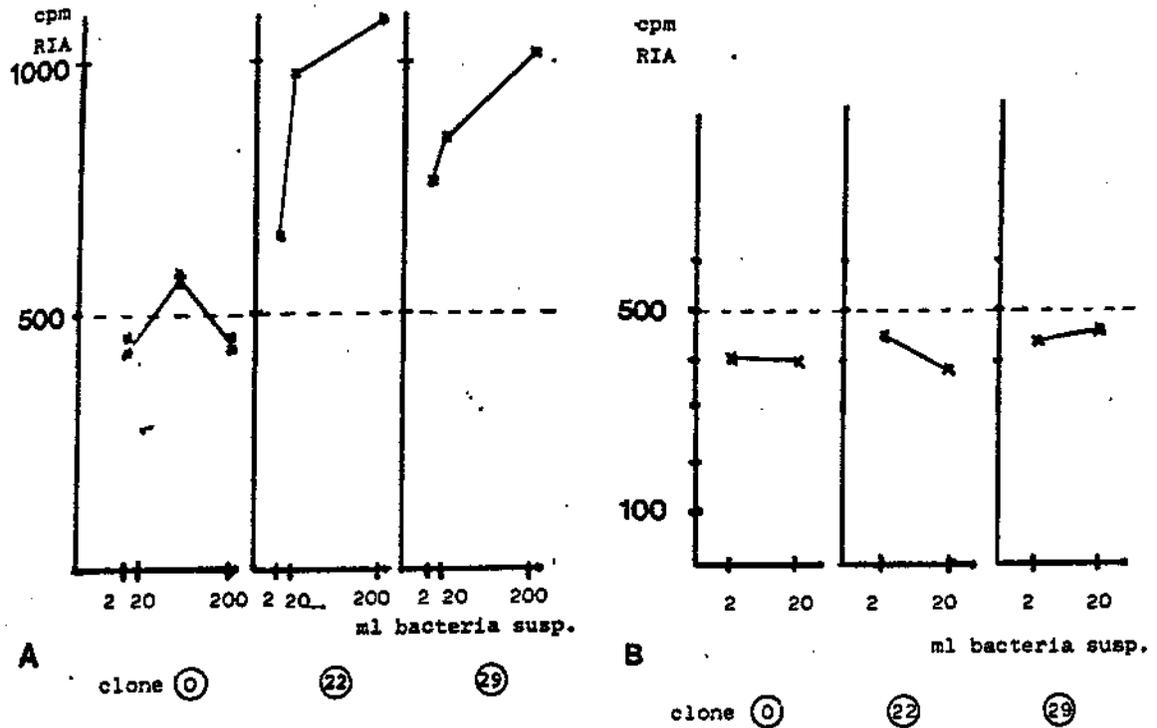


Fig 3.