

## Artículos originales completos

### Síntesis y secreción del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en células de mamíferos

A. PÉREZ, R. RODRÍGUEZ, R. LEONARD, I. GUILLÉN, L. HERNÁNDEZ, E. HERNÁNDEZ, C. SANTIZO, J. DE LA FUENTE y L. HERRERA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162,  
Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en mayo de 1988

#### RESUMEN

La infección por el virus de la hepatitis tipo B (HBV), es uno de los problemas más serios de la humanidad. La utilización de células de mamíferos en cultivo para la producción de una vacuna contra el HBV, ofrece un conjunto de ventajas en comparación con otros sistemas celulares. Nosotros hemos producido el antígeno de superficie de la hepatitis tipo B (HBsAg) recombinante, en células CHO utilizando el sistema de amplificación DHFR/mtx. Se obtuvo una producción de  $1 \mu\text{g HBsAg} / 10^6$  células / día, y el HBsAg recombinante fue caracterizado por microscopía electrónica y resultó similar a las partículas de HBsAg derivadas de plasma.

#### SUMMARY

Infection by Hepatitis B virus (HBV) is one of the most serious health problems of the human population. The use of mammalian cells in culture to produce an HBV vaccine offers a number of attractive features in comparison to the use of other cell substrates. We have produced the recombinant hepatitis B surface antigen (HBsAg) in CHO cells using the DHFR/MTX amplification system. A production of  $1 \mu\text{g HBsAg} / 10^6$  cells / day was obtained and the recombinant HBsAg was characterized by electron microscopy and resulted indistinguishable from the plasma-derived HBsAg particles.

#### INTRODUCCION

El virus de la hepatitis tipo B (HBV), es uno de los problemas de salud más serios en el mundo, por la gran incidencia de infecciones agudas y crónicas que provoca. La infección con el HBV está estrechamente relacionado con la aparición del cáncer del hígado (hepatocarcinoma primario) y se ha demostrado recientemente que la replicación viral incluye procesos de reverso-transcripción de un ARN intermediario, poseyendo de esta forma cierta analogía con los retrovirus.

Por esta razón, muchos grupos de investigaciones se han dedicado a la producción de una nueva vacuna contra el HBV por técnicas de ADN recombinante, y actualmente se encuentra en uso una vacuna proveniente de levadura.

El uso de células de mamíferos como hospederos para la expresión de proteínas recombinantes ha aumentado considerablemente en los últimos años. Se acepta,

generalmente, que lo procariotas y eucariotas inferiores no realizan correctamente las modificaciones postraslacionales de las proteínas. Como la mayoría de las proteínas de interés farmacéutico son glicosiladas, se ha comenzado a trabajar en sistemas de expresión en células de mamíferos.

La utilización de las células de mamíferos en cultivo para la producción de una vacuna contra el HBV ofrece un conjunto de ventajas en comparación con otros sistemas celulares. El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) producido por estas células es secretado al medio y su estructura antigénica es bioquímicamente y morfológicamente similar a las del HBsAg presente en el plasma (Zaradnik *et al.*, 1987).

En el presente trabajo reportamos la expresión, amplificación y secreción, y caracterización del HBsAg en células de ovario de hamster chino (CHO).

## MATERIALES Y METODOS

### Cultivos celulares

Las células CHO deficientes en dehidrofolato reductasa (DHFR-), fueron propagadas según Urlaub y Chasin, 1980. La expresión del DHFR se logró en medio Dulbecco MEM (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal y 35  $\mu\text{g/ml}$  de prolina. Todas las células estaban libres de micoplasma.

### Transfección

La transfección de las células CHO DHFR- con el pAD 46 se realizó según Kauffman R. J. *et al.*, (1982; 1984; 1985). En los transformantes se estudió la expresión de HBsAg utilizando un ELISA específico (ICBPVG).

### Hibridación por Southern

La hibridación por Southern se realizó esencialmente según Southern, E. M., 1975; 10  $\mu\text{g}$  de ADN procedente de los diferentes clones y subclones fue digerido con XbaI y EcoRI, y sometido al análisis. Como control negativo se utilizó la línea CHO DHFR-. Para la cuantificación del número de copias de HBsAg y DHFR por genoma celular 0,2, 1 y 5 ng del plasmidio pAD46 (equivalente a 2, 10 y 50 copias por genoma celular), fueron mezclados con 10  $\mu\text{g}$  de ADN procedente de la línea CHO DHFR- y digeridos con las enzimas XbaI y EcoRI. Como sondas se utilizaron el gen del HBsAg y el ADNc del DHFR murino, marcados con  $^{32}\text{P}$ dATP (300 Ci / mmol, Amershan, UK), con una actividad específica de  $10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  *et al.*, 1988).

### Amplificación genética

Los clones celulares seleccionados por la expresión de los genes de DHFR y HBsAg fueron crecidos en presencia de Metrotexate (Schimke R.T., 1984) en concentraciones crecientes de 20, 50, 100, 150 y 200 nM. Se seleccionaban cada vez los clones con mejor nivel de expresión del HBsAg, para ser enfrentados nuevamente con dosis mayores de la droga.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para la expresión del HBsAg en células CHO, su región codificante fue insertada en un vector de expresión bajo el control del promotor tardío del adenovirus 2 (Kaufman, R. J., 1986) (figura 1). El plasmidio contiene el origen de replicación y *enhancer* del virus SV 40, el promotor tardío, líder e intron del adenovirus 2 (Kauffman, R. J., 1986); la región codificante para el HBsAg (Alvarez *et al.*, 1988); el ADNc del DHFR de ratón (Kauffman, R. J. 1986); la señal de poliadenilación temprana del SV 40 y los genes asociados a virus (VA) del adenovirus 2 (Kauffman, R. J., 1986); todo en un derivativo de pBR 322.

El plasmidio recombinante pAD46 (figura 1) fue transfectado en células CHO DHFR- (Urlaub y Chasin, 1980). Según se muestra en la tabla 1, la selección de clones resistentes a Metrotexate (MTX) permitió la amplificación de secuencias del HBV y un incremento en la producción de HBsAg.

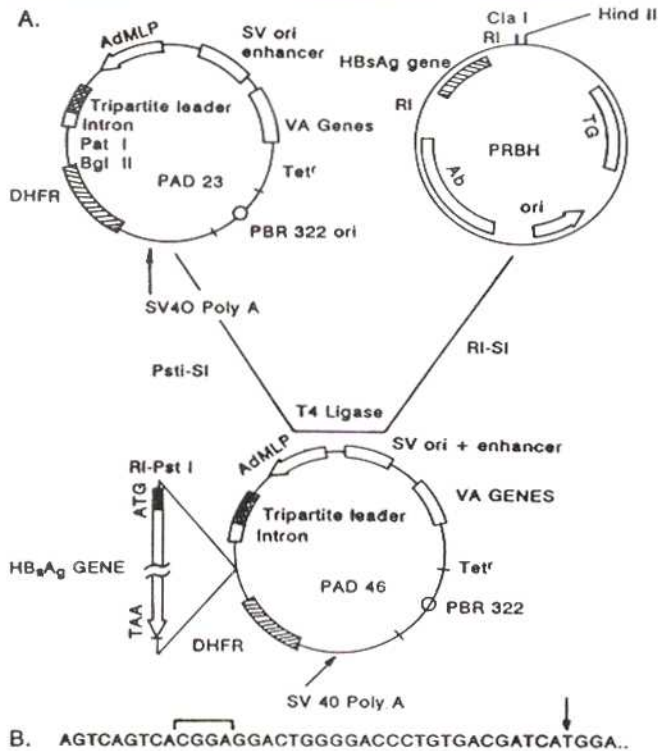


FIG. 1: a) Construcción del plasmidio de expresión pAD46; b) Secuencia de nucleótidos correspondiente a la unión entre el pAD23 y el gen del HBsAg. (La zona de unión y el codón de iniciación, están indicados.)

Tabla 1  
SINTESIS DE HBsAg EN DIFERENTES CLONES RESISTENTES A MTX

Clon	HBsAg:ng/10 <sup>6</sup> células/día						Incremento
	no MTX	20	50	100	150	200	
AD46*	1	-	-	-	-	-	-
EHP8	-	7,8	65	81	-	338	> 300
A8A6	-	3,75	53,5	90	207	-	> 200
A8A8	-	3,75	61,25	-	-	-	> 60
A12D3	-	1,04	10,03	-	-	-	10
B12H9	-	1,09	62	48	-	-	> 40
A11IOF3	-	4,3	56,6	-	-	-	> 50
A5B5	-	1,7	-	108	-	-	> 100
A8A4	-	3,75	59,7	142	-	-	> 140
A5F7	-	1,7	28	-	-	-	> 25

\* AD46 -Clon parental.

El sobrenadante fue colectado y analizado utilizando un ELISA específico (ICBPVG).

El DHFR ha sido utilizado por otros autores como marcador selectivo en la transformación de las células CHO DHFR- y para la expresión de diferentes genes y ADNc (Scahill *et al.*, 1983; Lasky *et al.*, 1984). El procedimiento de coamplificación DHFR /MTX ha sido utilizado previamente para aumentar la expresión de diferentes proteínas en células CHO (Ringold *et al.*, 1981; Kauffman y Sharp, 1982; Haynes y Weissmann, 1983; Kaufman, 1983; Mc Cormick *et al.*, 1984; Michel *et al.*, 1985; Zettlmeissl *et al.*, 1987).

El aumento obtenido en la expresión fue diferente en los distintos clones. Esta variabilidad, probablemente, se presenta a causa de la inserción del pAD en diferentes zonas del cromosoma en cada uno de los clones, así como a deleciones ocurridas durante la amplificación (Stark *et al.*, 1984; Michel *et al.*, 1985).

El número de secuencias de ADN de HBsAg y DHFR por clon, se determinó por Southern. Como se muestra en HBsAg y el número de secuencias de HBV por célula. Esto indica que las secuencias amplificadas contienen genes funcionales y no funcionales.

Tabla 2  
SINTESIS DE HBsAg Y AMPLIFICACION GENICA

Clon	HBsAg		ADN de HBV		cADN de DHFR	
	ng/millón células/día	incremento	copias/célula	amplificación	copias/célula	amplificación
AD 46	1	-	1	-	1	-
A8A4	3,75	3,75	<4	<4	40	40
E1AB	61,25	2	2	2	20	20

Leyenda:

AD 46 es el clon parental; A8A4 y E1A8 son subclones resistentes a 20 y 50 nM MTX respectivamente (tabla 1). El número de copias de HBV y DHFR fue determinado por hibridización, por Southern.

Nosotros obtuvimos líneas celulares que sintetizaban y secretaban hasta 1  $\mu$ g HBsAg /  $10^6$  células / día. Estos niveles de expresión, aunque menores que los reportados por Michel *et al.*, 1985, utilizando un sistema de amplificación similar al nuestro, son altos, y permitirían la obtención de gran cantidad de HBsAg para su purificación.

Los clones con niveles de expresión mayores de 200 ng HBsAg /  $10^6$  células / día, fueron muy inestables y difíciles de mantener por más de tres pases. Después del primer pase, observamos lentitud en el crecimiento y cambios morfológicos que llevaban finalmente a la muerte celular. Estas observaciones pudieran ser explicadas por la acumulación de vesículas de HBsAg en el retículo endoplásmico con consecuencias letales para la célula (Chisani *et al.*, 1987).

Para poder aislar clones estables con altos niveles de expresión, es necesario diferenciar individualmente un alto número de clones en los diferentes pasos de amplificación. De esta forma, pueden lograrse clones productores estables, con crecimiento normal. El grupo de R. E. Streeck (Michel *et al.*, 1985) logró clones con estas características sólo después del primer paso de amplificación, ya que los clones en los pasos subsiguientes presentaron problemas de inestabilidad.

Las partículas secretadas de 22 nm fueron caracterizadas por microscopía electrónica (figura 2a) y resultaron indistinguibles morfológicamente de las derivadas de suero de paciente (figura 2b).

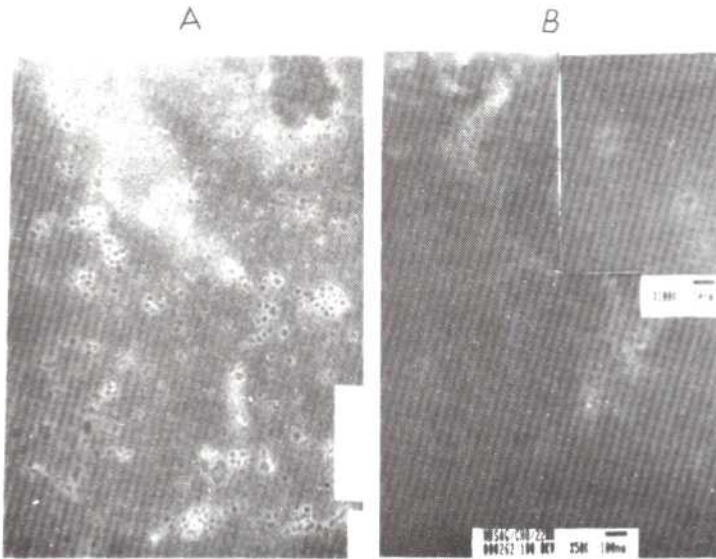


FIG. 2. Caracterización por microscopía electrónica de las partículas secretadas de HBsAg: a) HBsAg derivado de suero de pacientes; b) HBsAg recombinante producido en células CHO. El medio fue incubado con antisuero de conejo anti-HBsAg y al precipitado se le hizo tinción negativa con acetato de uranilo.

### CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en este trabajo demuestran la potencialidad de los sistemas en células de mamíferos para la expresión y secreción de un importante producto, con posibles aplicaciones como una vacuna contra el HBV,

La síntesis del HBsAg en células animales o levadura constituye para, el futuro mediato, la alternativa más apropiada para la producción de una vacuna contra el HBV.

### REFERENCIAS

- ALVAREZ, R.; P. RODRIGUEZ; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1988). *Expresión del antígeno de superficie de la hepatitis tipo B por un virus vaccinia recombinante*. Interferón y Biotecnología (en prensa).
- CHISANI, F. V.; P. FILIPPI; J. BURAS; A. McLACHLAN; H. POPPER; C.A. PINKERT; R. D. PALMITER y R. L. BRINSTER (1987). *Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polipeptide in transgenic mice*. P.N.A.B. **84**: 6909-6913.
- HAYNES, J. y CH. WEISSMANN (1983). *Constitutive long-term production of human interferons by hamster cells containing multiple copies of a cloned interferon gene*. Nucleic Acids Research **11**: 687-705.
- KAUFMAN, R. J. y P. A. SHARP (1982). *Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene*. J. Mol. Biol. **152**: 601-621.
- KAUFMAN, R. J.; L. C. WARLEY; A. J. SPILIOOTES; S. D. GOSSELS; S. A. LALT; G. R. LARSEN y R. M. KAY (1985). *Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells*. Mol. Cell. Biol. **7**: 1750-1759.
- KAUFMAN, R. J. (1986). *Translational efficiency in transfected COS cells enhanced by the adenovirus VA genes. Translational Control*. Current Communications in molecular biology. C.S.H.
- KINGSTON, R. E.; R. J. KAUFMAN y P. A. SHARP (1984). *Regulation of transcription of the adenovirus E II promoter by E1A gene products: absence of sequence specificity*. Mol. Cell. Biol. **4**: 1970-1977.

- LASKY, T. A.; D. DOWBENKO; C. SIMONSEN y P. W. BERMAN (1984). *Protection of mice from lethal Herpes Simplex Virus infection by vaccination with a secreted form of cloned glycoprotein D*. *Bio/Technology* **2**: 227-532.
- Mc CORMICK, F.; M. TRAHEY; M. INNIS; B. DIECKMAN y RINGOLD (1984). *Inducible expression of amplified human beta interferon genes in CHO cells*. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 166-172.
- MICHEL, M.; E. SOBAZAK; Y. MALPIECE; P. TIOLLAIES y R. E. STREECK (1985). *Expression of amplified hepatitis B surface antigen genes in Chinese hamster ovary cells*. *Bio/Technology* **3**: 561-566.
- RINGOLD, G.; B. DIECKMAN y F. LEE (1981). *Co-expression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the E. coli XGPRT gene in Chinese hamster ovary cells*. *J. Mol. Appl. Genetics* **1**: 165-175.
- SCAHILL, S. J.; R. DEVOS; J. VAN DER HEYDEN y W. FIERS (1983). *Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells*. *P.N.A.S.* **80**: 4654-4658.
- SCHIMKE, R. T. (1984). *Gene amplification in cultured animal cells*. *Cell*. **37**: 705-713.
- SOUTHERN, E. M. (1975). *Deletion of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- STARK, G. R. y G. M. WAHL (1984). *Gene amplification*. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 447-491.
- URLAUB, G. y L. A. CHASIN (1980). *Isolation of Chinese hamster ovary cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity*. *P.N.A.S.* **77**: 4216-4220.
- ZARADNICK, J. M.; R. COUCH y L. L. GENERIN (1987). *Safety and Immunogenicity of purified hepatitis B virus vaccine prepared by using recombinant DNA technology*. *J. of Inf. Diss.* **155**: 903-908.
- ZETTLMEISL, G.; H. RAGG y H. E. KARGES (1987). *Expression of biologically active human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells*. *Bio/Technology* **5**: 720-725.