

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et antistof mod HBsAg. Fremgangsmåden er ejendommelig ved, at man immuniserer et dyr med Hepatitis B virus HVB-fri HBsAg syntetiseret i gær og renser HBV-frit antistof fra dyrets serum.

I det følgende beskrives biosyntese af et antigen af humant Hepatitis B virus (HBV) ved hjælp af gær, tilvejebragt ved anvendelse af rekombinant DNA teknik. Hepatitis B virus betragtes som et større, verdensomspændende alment sundhedsproblem. Foruden den udbredte forekomst af viral hepatitis og persistensen af asymptomatiske bærerstadier har Hepatitis B virus været impliceret i ætiologien af hepatocellulær carcinom. Se Tiollais, P., et al., Science 213, 406 (1981) for en nyere oversigt over den molekylære biologi for Hepatitis B virus.

Et større forsøg i den løbende forskning er at fremstille en egnet vaccine til tilvejebringelse af beskyttende immunitet mod viral infektion. En indgangslinje til fremstilling af en egnet vaccine har involveret forsøg på at rense den antigene hovedkomponent i viruset, overfladeantigenet. Herefter anvendes symbolet HBsAg til at identificere HBV-overfladeantigen opnået fra præparater af intakt virus (Dane-partikler) eller rensset fra serum af hepatitisbærere. Skelly, J. et al., Nature 290, 51 (1981) har rapporteret rensningen af vandopløselige proteinmiceller af rensset HBsAg. En betydelig begrænsning i denne tilnærmelse har været, at mængden af materiale, som kan fremstilles, afhænger af tilgængeligheden af donorer. Der kendes ingen teknik til at dyrke viruset i kultur; derfor er der foruden begrænsninger i mængden af kildemateriale en risiko for kontaminering eller forurening af vaccinen med aktivt virus eller andre komponenter fra donorserum, og der er mulighed for heterogenitet i produkter opnået fra forskellige donorer.

En anden tilnærmelse har været forsøget på at syntetisere peptider, der frembringer antistoffer mod HBsAg baseret på aminosyresekvensen i proteinet udgørende overfladeantigenet (S-protein) og modulstudier forudsigende de mest sandsynlige antigene determinanter. Se f.eks. R.A. Lerner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3403 (1981). Et sådant arbejde er på et yderste indledningsvist stadium, og det kan være vanskeligt at bedømme, hvorvidt tilnærmelsen kan give antigener med en praktisk grad af immunogenicitet til en rimelig pris.

En tredje tilnærmelse, der gør brug af rekombinant-DNA-teknik, er syntesen af S-protein, HBsAg eller et immunologisk reaktivt ækvivalent med en mikroorganisme, hvorved en mikroorganisme udstyres med en genetisk evne til at danne S-protein, HBsAg eller et immunologisk reaktivt ækvivalent i store mængder i fravær af andre virale genprodukter. Denne tilnærmelse eliminerer muligheden for kontaminering af virus eller andre virale komponenter og tillader produktion i stor skala på økonomisk forsvarlig måde. Det er endvidere muligt ved passende manipuleringer af det genetiske materiale at modificere sekvensen i det protein, der udgør vaccinen, for at modificere dets bivirkninger eller gøre vaccinen polyvalent. Dertil er hele genomet af HBV blevet klonet i E. coli, og hele dets nukleotidsekvens er bestemt (Charnay, P. et al., Nucl. Acid Res. 7, 335 (1979); Galibert, F. et al., Nature 281, 646 (1979); Valenzuela, P. et al., Animal Virus Genetics (red. B. Fields, R. Jaenisch og C.F. Fox) Academic Press, New York, N.Y. (1980) side 57). Et enkelt område af dette genom viste sig at indeholde koden til S-protein og også til en lang forsekvens på 163 aminosyrer. Strukturen af HBsAg menes at bestå af to S-protein-kæder knyttet sammen med intermolekylære disulfidbindinger og holdt i en bestemt stadfæstelse med yderligere intramolekylære disulfidbindinger. En af de to kæder synes at være glycosyleret. I bærernes serum forekommer HBsAg ofte i form af

sfæriske partikler med en middeldiameter på 22 nm, hvilket menes at være aggregater af de netop beskrevne S-protein-dimere, og som muligvis indeholder lipider. I den virale kappe er HBsAg forbundet med den lipidholdige virale kappe, som menes at være afledt fra membrankomponenter i værtscellen.

HBsAg's antigenicitet og immunogenicitet afhænger af adskillige faktorer, der ikke alle er særlig godt forstået. Det er blevet iagttaget, at reduktion af disulfidbindingerne reducerer antigeniciteten og immunogeniciteten mærkbart (Mishiro, S. et al., J. Immunol. 124, 1589 (1980)). Derfor menes den tertiære konfiguration, der bidrages af de intramolekulære og intermolekulære disulfidbindinger, at bidrage til antigenicitet og immunogenicitet. Bidraget fra andre faktorer, såsom udstrækningen og naturen af glycosylering og associering med lipid, er uklart, skønt alt menes at bidrage i nogen grad. Aggregering i partikler, såsom ovennævnte 22 nm partikler, menes at bidrage væsentligt til forøgelse af immunogeniciteten.

S-proteinet er blevet syntetiseret i E. coli i form af et fusionsprotein (Edman, J.C. et al., Nature 291, 503 (1981)). Produktet indeholdt 183 aminosyrer af præ-beta-lactamase, 5-10 glycinrester og 204 aminosyrer af S-protein manglende 22 aminosyrer af aminoterminalenden. Fusionsproteinet var immunoudfældeligt med anti-HBsAg IgG.

Da det er kendt, at S-protein-dimere (Mishiro et al., supra) og 22 nm partikler med indhold af HBsAg (Cabrall, G.A. et al., J. Gen. Virol. 38, 339 (1978)) er mere antigene end det associerede S-protein, ville det være yderst ønskeligt at finde et biologisk system, der er i stand til at producere HBsAg eller et dermed immunologisk reaktivt ækvivalent direkte i væsentlige mængder.

Trinene til konvertering af S-protein til HBsAg eller til 22 nm partikler forstås ikke fuldt ud, og det vides heller ikke, i hvilken grad de er værtscellespecifikke. Endvidere synes S-protein-genet at kode for en usædvanlig lang præsekvens på 163 aminosyrer, hvis funktionelle betydning, hvis den har nogen, er ukendt. Det er faktisk uvist, hvorvidt præsekvensen rent faktisk translateres i den virusinficerede celle. Gær (*Saccharomyces cerevisiae*) blev valgt som værtscelle, i hvilken man ville forsøge ekspression af HBsAg, af følgende grunde: Gær dyrkes let i kultur i store mængder. Teknologien af gærkultur i stor skala forstås faktisk godt. Endvidere er gær eukaryotisk, så man håber, at nogle af de posttranslationale processer, som udføres i en normal værtscelle, kan udføres i gær. På grund af de komplekse posttranslationale begivenheder, som konverterer S-protein til HBsAg, hvoraf nogle kan være værtscellespecifikke, er den heri anvendte nomenklatur beregnet til at skelne forskellige antigene former, der iagttages fra det heri omhandlede arbejde. Det ubearbejdede translationsprodukt af strukturgenet for overfladeantigen kaldes S-protein. Det antigen, der isoleres fra plasma af inficerede donorer, fra Dane-partikler og fra humane hepatoma-cellekulturer, benævnes HBsAg. Ekspressionsproduktet fra overfladeantigen-genet i gær kaldes Y-HBsAg. Udtrykket immunologisk reaktivt ækvi- valent af HBsAg er en generel betegnelse for et vilkårligt immunologisk krydsreaktivt præparat omfattende S-protein eller en del deraf, hvorpå Y-HBsAg er et eksempel.

Gær har aldrig tidligere været anvendt til ekspression af generne fra et virus, som normalt mangfoldiggøres i en derfra forskellig organisme. Til teknikkens stade hørende forsøg på at udtrykke heterologe proteiner i gær har givet blandede resultater. Et forsøg på at udtrykke kaninglobin, under kontrol af dets egen promoter, synes at have været uden held ved translation af proteinet

(Beggs, J.D. et al., Nature 283, 835 (1980)). Et gen kodende for et Drosophila-gen har været rapporteret som værende i stand til at komplementere en gær-ade-8-mutant under betingelser med selektivt tryk til genetisk komplementering. Isolering af et funktionelt protein fra gærstammen har ikke været rapporteret. Genet for human leukocyt-interferon er blevet udtrykt i gær, under kontrol af gær-ADH1 (alkoholdehydrogenase) promoteren. I dette tilfælde krævede vellykket dannelse af et aktivt protein ikke posttranslational behandling eller samling af komponenter.

DNA-overføringsvektorer egnede til overføring og replikation i gær er blevet udviklet (Broach, J.R. et al., Gene 8, 121 (1979); Hartley, J.L. et al., Nature 286, 860 (1980)). De fleste gærvektorer, der for tiden er i anvendelse, er afledt fra E. coli vektorer, såsom pBR322, hvori der er blevet indsat et gær-replikationsstartområde. To typer gær-replikationsstartområder er tilgængelige. Det første, afledt fra et ubikvitært, naturligt forekommende gærplasmid, der almindeligvis betegnes som 2-mikron-cirklen, tildeler evnen til at replikere uafhængigt af gærkromosomalt DNA. En anden klasse vektorer indeholder en replikationsstartområdesekvens benævnt arsl (autonomous replication sequence), afledt fra det gærkromosomale replikationsstartområde, som også giver autonom replikationskapabilitet. Fordi der forefindes både bakterie- og gærreplikationsstartområder i samme vektor, kan de anvendes i begge organismer. Selektion kan foretages for bakterielle systemer ved indføring af antibiotiske resistensgener, såsom ampicillin- og tetracyclinresistensgenerne fra pBR322. Selektion i gærssystemer kan typisk tilvejebringes ved indføring af et gærgen, der komplementerer en mutation i en egnet auxotrof værtsstamme. De studier, der er rapporteret heri, gør hensigtsmæssigt brug af gærvektorer indeholdende en promoter isoleret fra gærgenet, der koder for alkoholdehydrogenase (ADH1)

(J.L. Bennetzen et al., J. Biol. Chem., 257, 3018 (1982)).

ADH1-promoterområdet blev isoleret fra 5'-sideregionen af
5 gær-ADH1-genet. Et fragment indeholdende ca. 1600 basepar
af ADH1-sekvensen strækkende sig ud fra stilling -1550
til +17 i kodeområdet blev fusioneret med gær-CYC1-kod-
ningssekvensen. Studier af transkription af den tilknyt-
10 tede CYC1-kodningssekvens viste, at transkriptionsstart-
specificitet kunne overføres fra ét gærgen til et andet.
Mindre fragmenter, der mangler hele ADH-kodningsområdet,
har derefter været konstrueret og har vist sig i stand
til at udtrykke human interferon. Et sådant fragment, be-
tegnat 921, afsluttes efter stilling -9 og blev anvendt
15 ved de foreliggende studier.

Fordi der findes stoffer, der er reaktive med anti-HBsAg-
antistof på flere former, er der heri blevet anvendt en
nomenklatur for at skelne mellem disse former. Transla-
20 tionsproduktet af HBV-overfladeantigen-gen er benævnt S-
protein. S-protein har 226 aminosyrer, hvis sekvens er
blevet udledt fra nukleotidsekvensen af dets gen og ved
delvis sekvensanalyse. HBsAg som anvendt heri omfatter
hoved-overfladeantigenkomponenten af HBV, der findes i
25 inficerede patienters serum og i Alexander-celler, en
hepatocellulær carcinom-cellelinje, som syntetiserer og
udskiller 22 nm HBsAg-partikler (J.J. Alexander et al.,
S. Afr. Med. J. 50, 1124 (1976)). Både S-protein og HBsAg
er antigene, men sidstnævnte er mere reaktivt mod anti-
30 HBV-antistof og betragtes som mere immunogent. Da struk-
turen af HBsAg ikke er fuldt ud karakteriseret, og bi-
dragene til antigenicitet og immunogenicitet af forskel-
lige modificerende trin ikke forstås fuldt ud, omfatter
det heri anvendte udtryk HBsAg enhver modificeret form
35 for S-proteinet, som bidrager til dets antigene og
immunogene egenskaber, herunder, men ikke udelukkende,
demerisering, glycosylering og partikelsamling.

HBsAg kan syntetiseres i gær. Gærudtrykkelsesvektorer omfattende en gærpromoter, ADH1, har været konstrueret. Området af HBV-genomet, der koder for S-proteinet, bortset fra en mulig præsekvens på 163 aminosyrer, er blevet overført til gærudtrykkelsesvektoren.

Under anvendelse af den beskrevne gærvektor har man opnået vellykket syntese af HBsAg med gær. Produktet er antigenisk (reaktivt med anti-HBsAg), og en væsentlig del forekommer ifølge elektronmikroskopet associeret med partikler identiske med de, der findes i serum hos HBV-inficerede patienter og i Alexander-celler, men med mindre partikelstørrelsesdiameter. HBsAg syntetiseret med gær sedimenterer på samme måde som rensset, naturligt forekommende HBsAg-partikler rensset fra Alexander-celler som målt ved saccharose-gradient sedimentation. Den foreliggende opfindelse viser syntese og udformning af en multikomponent struktur af højere orden resulterende fra udtrykkelse af et heterologt DNA-kodningssegment i en mikroorganisme.

De heri præsenterede data viser, at Y-HBsAg er en partikulær, immunologisk krydsreaktiv ækvivalent af HBsAg, som afviger fra sidstnævnte på flere måder, skønt dens morfologiske udseende i elektronmikroskopet ligner HBsAg's udseende. Endvidere viser data, at Y-HBsAg kan være i det mindste lige så antigen pr. vægtenhed, som HBsAg, og Y-HBsAg kan være mindst lige så effektivt som HBsAg ved udlæsning af antistof, der er reaktivt over for HBsAg i gnavere og primater.

Udtrykkeshastigheden for S-protein-kodningssegmentet kan forbedres ved en række forskellige midler. Disse omfatter modificering af udtrykkelsesvektorerne til optimering af mellemrummet mellem promoteren og startcodonen i kodningssegmentet for at optimere hastigheden for translationsinitiationen. Additionen af en terminatorsekvens,

som dirigerer terminering af transkription ved et punkt i den 3'-utranslaterede region efterfulgt af stopcodonen af kodningssegmentet forbedrer udtrykkelse, sandsynligvis ved at stabilisere mRNA-transkripterne. I fraværet af et termineringssignal er det blevet iagttaget, at optimering af længden af den 3'-utranslaterede region i sig selv forøger udtrykkelse.

Tilpasningen af midler til forbedring af vektorstabilitet forøger også udbyttet af udtrykkelsesproduktet fra en kultur. Mange vektorer tilpasset til kloning i gær omfatter genetiske markører for at sikre vækst af transformerede gærceller under selektionstryk, f.eks. ved at indføre et TRP1-gen for at tillade væksten af en $trp1^-$ -vært i medium manglende tryptophan. Værtscellekulturer indeholdende sådanne vektorer kan indeholde store antal utransformerede segreganter, når de dyrkes under ikke-selektive betingelser, specielt når de dyrkes til høje celletætheder. Derfor er det fordelagtigt at anvende udtrykkelsesvektorer, som ikke kræver vækst under selektionsbetingelser, for at muliggøre vækst til stor tæthed og for at minimere andelen af utransformerede segreganter. Vektorer, som indeholder en væsentlig del af det naturligt forekommende 2-cirkel-plasmid, er i stand til at replicere stabilt med minimal segregation af utransformerede celler, selv ved stor celletæthed, når der transformeres i værtsstammer, der hidtil har manglet 2-mikron-cirkler. Sådanne værtsstammer betegnes cirkel nul (cir^0) stammer. Desuden kan hastigheden for cellevæksten ved lav celletæthed forbedres ved inkorporering af regulerende kontrol med promoteren, så at udtrykkelsen af S-proteinkodningsregionen minimeres i fortyndede kulturer, såsom den tidlige log-fase til mellem-log-fasen, og derpå anvendes til maksimal udtrykkelse ved høj celletæthed. En sådan kontrolstrategi forøger effektiviteten af cellevæksten i fermenteringsprocessen og reducerer yderligere frekvensen af segregation af utransformerede celler.

I de efterfølgende eksempler er mange af teknikkerne, reaktionerne og separationsprocedurerne allerede velkendte i teknikken. Alle enzymer er, med mindre andet er angivet, tilgængelige fra én eller flere kommercielle kilder, såsom New England BioLabs, Beverly, Massachusetts; Collaborative Research, Waltham, Massachusetts; Miles Laboratories, Elkhart, Indiana; Boehringer Biochemicals Inc., Indianapolis, Indiana og Bethesda Research Laboratory, Rockville, Maryland, for at nævne nogle få repræsentative kilder. Puffere og reaktionsbetingelser for restriktionsenzymnedbrydning blev anvendt ifølge anbefalinger givet af fremstilleren for hvert enzym. Delvise nedbrydninger med restriktionsenzymer blev udført under anvendelse af en reduceret enzymkoncentration, som var forudbestemt ved indledende forsøg for hver enzymportion. Standardmetodologi for andre enzymreaktioner, gelelektroforese-adskillelser og E. coli transformation findes i Methods in Enzymology, bind 68, red. Ray Wu, Academic Press (1979). Transformation af gærprotoplaster blev udført i det væsentlige som beskrevet af Beggs, (Nature 275, 104-109 (1978)).

Stammer af E. coli, der er nyttige til transformation, omfatter X1776; K12 stamme 294 (ATCC nr. 31446); RR1 og HB101. Gærstammer XV610-8c med genotypen (a ade2 ade6 leu2 lys1 trp1 can1) og GM-3C-2, G. Faye et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2258 (1981) Genotype: (α Leu2 Trp1 His4 CYC1-1 CYP3-1), blev anvendt til gærtransformationer. Bakterier blev dyrket og valgt efter procedurer beskrevet af J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972). Gær blev dyrket på følgende medier: YEPD indeholdende 1% (vægt/volumen) gærekstrakt, 2% (vægt/volumen) pepton og 2% (vægt/volumen) glucose; og i tilfælde af plademedier 3% (vægt/volumen) agar. YNB plus CAA indeholdt 6,7 g gær-nitrogenbase (Difco Laboratories, Minneapolis, Minnesota), 10 mg adenin, 10 mg uracil, 5 g casami-

nosyrer (CAA) (Difco), 20 g glucose; og i tilfælde af plademedier 30 g agar pr. liter. Selektion for tryptophan-prototrofi blev foretaget på plader indeholdende 6,7 g gær-nitrogenbase (manglende aminosyrer) og supplementet for alle vækstkrav for stammen, der skulle overføres, bortset fra tryptophan.

På den tilhørende tegning, hvortil der henvises i de efterfølgende eksempler viser:

10

fig. 1 et kort af pFRP-921,

fig. 2 konstruktionen af pMA56,

15

fig. 3 en elektronmikrograf af HBsAg syntetiseret i gær,

fig. 4 konstruktionen af pHBS5-3,

20

fig. 5 et diagram af konstruktionen af pHBS16-3, pHBS16-4 og pHBS16-5,

fig. 6 et restriktionskort af pCl/1 og dens anvendelse ved konstruktion af pHBS56, og

25

fig. 7 konstruktionen af to vektorer af pHBS56-rækken, pHBS56-3 og pHBS56-5.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

30

EKSEMPEL 1

Konstruktion af gærvektorer

35

To gærvektorer er blevet konstrueret, en med arsI-replikationsstartområde, den anden omfattende et 2 μ cirkelreplikationsstartområde.

Plasmid pFRP-921 er tidligere beskrevet af Hitzeman et al., Nature 293, 717 (1981). Vektoren indeholder ampicillin- og tetracyclinresistensgenerne og replikationsstartområde fra bakterielt plasmid pBR322, gær arsl-replikationsstartområde og trp1-gen sammen med ADH1-promoterfragmentet, betegnet 921, afsluttet efter stilling -9 i nukleotidsekvensen. Fig. 1 viser et kort af pFRP-921.

Plasmid pMA56 indeholdt sekvensen af bakterieplasmid pBR322, et gær trp1-gen for selektion i gær, gær 2 μ cirkel-replikationsstartområdet og et ADH1 promoterfragment betegnet 906 afsluttet efter nukleotid -15 ved 3'-enden. Trin og konstruktion af pMA56 er skitseret som følger og afbildet i diagrammet i fig. 2.

Plasmid YRp7' (D.T. Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979)) indeholdende gær trp1- og arsl-sekvenser indsat ved EcoRI-stedet i pBR322 blev anvendt som udgangsmateriale. Som følge af indsætning af gærsekvensen indeholdt plasmid to EcoRI-steder (fig. 2). Et af disse steder blev fjernet ved delvis nedbrydning med EcoRI-endonuklease til nedbrydning i gennemsnit af kun to af stederne pr. molekyle. De resulterende uparrede ender af de lineære molekyler blev udfyldt ved reaktion katalyseret med DNA polymerase I (Klenow fragment), og de resulterende afstumpede ender blev genforenet ved en DNA-ligasekatalyseret reaktion til genoprettelse af et lukket cirkulært DNA-molekyle. Et af de resulterende plasmider, betegnet pFRT, blev valgt, da det havde bibeholdt EcoRI-stedet ved siden af arsl-området.

Som vist på fig. 2 blev arsl-replikationsstartområdet omgivet af et PstI-sted og et EcoRI-sted. På samme tid indeholdt plasmid YEp13 (Broach et al., supra) 2 μ cirkel-replikationsstartområde tilsvarende omgivet af et PstI-sted og et EcoRI-sted. Derfor gav spaltning af pFRT og YEp13 med PstI- og EcoRI-endonukleaser et stort line-

ært fragment manglende et gærreplikationsstartområde fra pFRT og et lille DNA-fragment omfattende 2 μ cirkel-replikationsstartområdet fra YEpl3. Plasmid pFRT blev nedbrudt med PstI-endonuklease under partielle nedbryd-
ningsbetingelser til reduktion af hyppigheden af spaltning ved PstI-stedet inde i ampicillinresistensgenet. De
5 ønskede fragmenter blev rensset ved præparativ gelelektroforese, blandet sammen og covalent knyttet sammen i en DNA-ligasekatalyseret reaktion. Det resulterende plasmid,
10 betegnet pMW5, blev valgt for dets evne til at udvise ampicillinresistens.

ADH1-fragment 906 blev indsat i pBR322 mellem stederne BamHI og EcoRI. Promoterfragmentet blev frigjort ved ned-
brydning med BamHI- og EcoRI-endonukleaser. Et fragment
15 på 1,5 kilobaser (kb), ADH1-906 fragmentet, blev isoleret ved præparativ gelelektroforese. Plasmid MW5 blev tilsvarende nedbrudt med EcoRI- og BamHI-endonukleaser. Det store fragment, der havde en EcoRI-specifik ende og en
20 BamHI-specifik ende, blev isoleret ved præparativ gelelektroforese, blandet med ADH1-906 fragmentet og covalent samlet ved en DNA-ligasekatalyseret reaktion. Det resulterende plasmid, betegnet pMA56 og vist i fig. 2, blev valgt ved ampicillinresistens i E. coli.

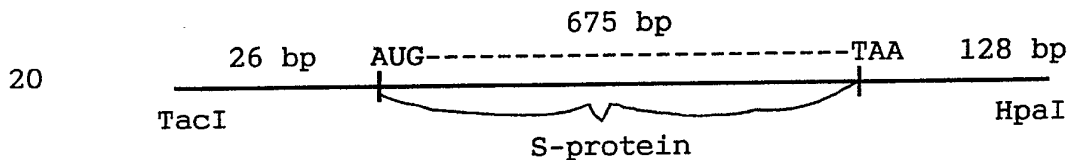
25 Plasmider pFRP-921 og pMA56 er strukturelt lignende, idet de primært afviger ved at have et arsl-replikationsstartområde (pFRP-921) eller et 2 μ cirkel-replikationsstartområde (pMA56). Desuden afviger ADH1-promoterfragmenterne
30 lidt som beskrevet. Begge er hinanden lig ved at have bakterielt replikationsstartområde og selektionsmarkører for vækst i E. coli. Begge indeholder et gær TRP1-gen til at tillade selektion i gær trp1-værtsstammer.

35

EKSEMPEL 2Konstruktion af et gærplasmid indeholdende det S-protein-kodende område

5

Analyse af nukleotidsekvensen i HBV DNA rapporteret af P. Valenzuela et al. i *Animal Virus Genetics*, Academic Press, New York, N.Y. (1980), pp. 57-77, viste beliggenheden af S-protein-kodningsområdet. Området er indeholdt i TacI-HpaI-fragmentet af 835 basepars længde. Dette fragment indeholder 26 basepar forud for AUG-codonen for det N-terminale methionin i S-proteinet. (Det meste af området kodende for den formodede præsekvens beskrevet supra såvel som de første to AUG-codoner mangler fra TacI-HpaI-fragmentet). Fragmentet indeholder også hele det S-protein-kodende område (678 bp), en TAA-stopcodon og 128 bp efter stopcodonen.



25

Ca. 500 μ g af DNA fra plasmid pHBV-3300 (P. Valenzuela et al., *Nature* 280, 815 (1979)) blev nedbrudt til fuldendelse med en kombination af restriktionsenzymene EcoRI og HpaI. Ca. 60 μ g af fragmentet EcoRI-HpaI på 965 basepar blev isoleret ved præparativ gelelektroforese i agarose. Dette fragment blev derpå nedbrudt til fuldstændighed med restriktionsenzymet TacI. Ca. 30 μ g af det 835 basepar TacI-HpaI-fragment blev isoleret ved præparativ gelelektroforese i agarose.

35

835 bp fragmentet blev behandlet til tilvejebringelse af EcoRI-specifikke ender ved tilsætning af EcoRI-linker-oligonukleotider (tilgængelige i handelen fra Collabora-

5 tive Research, Waltham, Massachusetts). Linker-oligonukleotiderne blev knyttet sammen til ca. 3-5 µg af fragmentet ved stump-enderligering katalyseret med T4 DNA-ligase. Fragmentet blev derpå nedbrudt med EcoRI-endonuklease til spaltning af uomsatte og selv-ligerede linkere og til fremstilling af EcoRI-specifikke uparrede ("klæbrige") ender.

10 Plasmid pFRP-921 blev nedbrudt med EcoRI-endonuklease og behandlet med alkalisk phosphatase til undgåelse af selv-ligering (J. Shine, US Patentskrift nr. 4 264 731). En blanding af TacI-HpaI-fragmentet med EcoRI-ender og EcoRI-nedbrudt pFRP-921 blev inkuberet med DNA-ligase til
15 dannelsen af covalent lukket cirkulært DNA med S-proteinkodningsfragmentet indsat i gærvektoren. De resulterende plasmider blev anvendt til transformation af E. coli selekterende for ampicillinresistens. Begge mulige orienteringer af S-protein-kodningssekvensen med hensyn til gærpromotoren blev isoleret og karakteriseret ved de
20 spaltningsprodukter, der resulterede fra behandling med et restriktionsenzym virkende på et asymmetrisk lokaliseret sted inde i HBV-insertionen. Plasmider pHBS-11 (i korrekt orientering) og pHBS-12 (modsat orientering) blev valgt og forstærket i E. coli.

25 Foregående procedure blev anvendt som beskrevet under anvendelse af pMA56 i stedet for pFRP-921 til indsætning af TacI-HpaI S-protein-kodningsfragmentet i pMA56 ved EcoRI-stedet. To plasmider blev isoleret og karakteriseret,
30 pHBS-16 indeholdende det virale gen i den korrekte orientering med hensyn til ADH1-promoteren, og pHBS-20 med S-protein-genet i den modsatte orientering.

EKSEMPEL 3Syntese af HBsAg i gær

5 Protoplaster af gærrecipient stammen XV610-8C eller GM3
C-2 blev separat inkuberet med DNA fra hver af fire plas-
mider, pHBS-11, pHBS-12, pHBS-16 og pHBS-20, under de be-
skrevne transformationsbetingelser og anbragt på agar-
plader i medium uden tryptophan. Overlevende kolonier,
10 transformeret til tryptophan-prototrofi, blev isoleret.
Til prøve for HBsAg-syntese blev gærstammer transformeret
med hver af de fire plasmider separat dyrket i væske-
formige kulturer, i medium uden tryptophan, og høstet i
mellem-log-fasen. Cellerne blev samlet ved centrifuge-
15 ring, og celleekstrakter blev fremstillet ved formaling
af cellerne med glasperler i puffer af 0,01 M natrium-
phosphat (pH 7,4) indeholdende 0,01 M beta-mercapto-
ethanol og 0,1 vol-% NP-40 detergent [polyoxyethy-
len(9)octaphenol]. Tilstedeværelsen af HBV-overflade-
20 antigen blev afprøvet under anvendelse af et radioimmun-
forsøgsudstyr, der er tilgængeligt i handelen fra Abbot
Laboratories, North Chicago, Illinois. Kvalitativt gav
plasmiderne indeholdende overfladeantigen-kodningsfrag-
mentet i korrekt orientering, pHBS-11 og pHBS-16, let de-
25 tekterbare mængder af overfladeantigen, hvorimod der ikke
blev fundet noget detekterbart overfladeantigen i eks-
trakter af celler transformeret ved pHBS-12 eller pHBS-
20. Kvantitativt gav en 200 ml kultur af XV-610-8C inde-
holdende pHBS-16 1-2 µg overfladeantigenprotein. Celler
30 indeholdende pHBS-11 gav 1/2 - 1/3 så meget overflade-
antigen, muligvis på grund af et lavere kopital pr. celle
af plasmider med arsl-replikationsstartområde.

Alle celleekstrakter blev analyseret ved saccharosegradi-
35 entsedimentering. Foruddannede saccharosegradienter på 5-
30% (vægt/volumen) blev lagdelt med en ekstrakt af XV-
610-8C/pHBS-16-celler fremstillet som beskrevet, og kon-

trolgradienter blev lagdelt med en fremstilling af HBsAg rensset fra en Alexander-cellekultur. Gradienterne blev centrifugeret i en svingende beholderrotor i 8 timer ved 27000 omdr./min. Efter centrifugering blev der opsamlet
5 fraktioner, som blev afprøvet ved den i det foregående beskrevne radioimmunprøve. Overraskende viste det sig, at HBsAg syntetiseret ved hjælp af gær havde nøjagtig samme sedimentationsegenskaber som HBsAg isoleret fra Alexander-celler. En sedimentationsværdi på ca. 60 S blev be-
10 regnet for begge HBsAg-præparater.

HBsAg syntetiseret med gær blev rensset ved en kombination af ligevægtscentrifugering i cæsiumchlorid og sedimentation i en saccharosegradient. 100 ml celler dyrket til en
15 O.D. på 2,0 ved 650 nm blev høstet ved centrifugering til opnåelse af 0,150 ml pakkede celler. Celleekstrakterne blev fremstillet ved formaling af cellerne med glasperler (som beskrevet i det foregående) således, at efter centrifugering ved 6000 omdr./min i 15 minutter til fjernelse af cellerester dannedes et totalvolumen på 0,5 ml ekstrakt. Ekstraktet indeholdt ca. 30 mg/ml protein og ialt ca. 1 µg HBsAg. Ekstraktet blev lagdelt på en diskontinuerlig cæsiumchloridgradient fra 1,1 g/cm³ til 1,4 g/cm³ og centrifugeret i en svingende beholderrotor (SW1,
20 Beckman Instrument, Fullerton, California) ved 30000 omdr./min i 24 timer. Efter centrifugering blev der som før opsamlet og afprøvet fraktioner. Et kontrolrør indeholdende Alexander-celle-HBsAg blev behandlet identisk, som en markør. Gær-HBsAg vandrede med Alexander-celle-HBsAg-spidsen, med en aerometer-massefylde på 1,19 g/cm³.
30 Fraktioner indeholdende gær-HBsAg blev samlet, dialyseret og anbragt på en 5-30% (vægt/volumen) foruddannet saccharosegradient og centrifugeret ved 30000 omdr./min i 36 timer. Igen faldt spidsen for gær-HBsAg som tidligere observeret nøjagtigt sammen med spidsen for HBsAg fra Alexander-celler. Samlede spidsfraktioner havde en total proteinkoncentration på 0,01 mg/ml og et totalt udbytte
35

på 15% HBsAg.

Det fremgik af sedimentationsdata, at HBsAg blev syntetiseret i gær i form af partikler eller aggregater. Naturen af disse partikler blev yderligere karakteriseret ved elektronmikroskopi. HBsAg-partikler syntetiseret fra gær og rensed som beskrevet blev adsorberet på kulfilmgitre og fremkaldt med uranylacetatfremkaldet (2% efter vægt/volumen i 7 minutter). Under elektronmikroskopet blev det iagttaget, at partikler af HBsAg syntetiseret i gær havde et udseende identisk med Alexander-celle-HBsAg, men en mindre diameter. Ved disse studier havde Alexander-celle-HBsAg-partikler en diameter på ca. 20 nm, hvorimod Y-HBsAg-partikeldiameteren var ca. 16 til ca. 17 nm (se fig. 3). Disse resultater menes at være den første demonstration af udformningen til en højere ordens struktur af heterologt protein i en mikroorganisme-vært.

Højere udbytter, op til det femdobbelte, er blevet opnået under anvendelse af gærstamme GM3C-2 som vært. Stammen er en lille stamme, hvis forøgede afhængighed af kulhydratmetabolisme kan resultere i en højere aktivitet for ADH-promotoren. Det høje udtrykniveau opnået i GM-3C-2 kan også være resultat af anvendelse af en modificeret vektor, pHBS-25, indeholdende S-protein-kodningsfragmentet flankeret af et ADH1-promotorfragment og et ADH-termineringsfragment. TacI-HpaI HBV-kodningssegmentet blev udstyret med HindIII-oligonukleotid-linkere og sammenknyttet ved 5'-enden til ADH1-promoterfragmentet ADH1-906 termineret i en HindIII-linkersekvens ved dets 3'-ende. 3'-enden af HBV-segmentet blev knyttet til et 450 bp HindIII-BamHI-fragment af ADH1-genet indeholdende kodningsområdet for de 43 C-terminale aminosyrer af ADH, stopcodonen TAA og en del af den 3'-uoversatte del (se Bennetzen et al., J. Biol. Chem., bind 257, p. 3018 (1982), så begge fragmenter blev opnået i samme transkriptionsretning. Det resulterende sammensatte segment,

ADH-H-5-S-protein-ADH-terminator, var flankeret af BamHI-steder, hvilket tillod indsætning ved BamHI-stedet af pMA56. Efter indsætning, så ADH-terminatorsektionen var ved siden af ADH1-906-promoterfragmentet, blev den resulterende vektor betegnet pHBS-25.

Konstruktionen af vektorer af 25-serien analoge med pHBS56-3 og pHBS56-5 (eksempel 6) opnås let under anvendelse af de sammensatte gener for S-protein flankeret af ADH-promoteren og terminatorsegmenterne som beskrevet i eksempel 6. Det sammensatte gen afledt fra pHBS16-3 indsættes ved SphI-stedet i pMA56, lineariseret ved SphI-nedbrydning og behandlet med alkalisk phosphatase til undgåelse af rekonstituering af pMA56 i fravær af det indsatte sammensatte gen som beskrevet af Shine, US patentskrift nr. 4 264 371. I denne konstruktion afviger pHBS25-3 og pHBS25-5 fra pHBS25 derved, at det sammensatte gen er indsat ved SphI-stedet i pMA56 i stedet for i det nærliggende BamHI-sted i pMA56.

Overføringsvektoren pHBS-16 og en gærstamme omfattende stammen XV610-8C transformeret af plasmid pHBS-16 er blevet deponeret i American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland.

25

EKSEMPEL 4

Dette eksempel viser fjernelse af et 5'-utranslateret segment af HBV-DNA. DNA-segmentet omfattende S-proteinområdet isoleret som beskrevet i eksempel 2 indeholdt et utranslateret 26-baseparsegment ved 5'-enden af kodningsregionen, liggende mellem promoteren og ATG-startcodonen. Følgende procedurer blev udviklet til fjernelse af alle eller alle på nær én af baserne af det 5'-utranslaterede område af HBV-DNA foran S-protein-kodningsområdet.

35

Plasmidet pHBS-5 blev nedbrudt med EcoRI-endonuklease, hvilket gav et fragment med ca. 850 basepar indbefattende S-protein-kodningsområdet og flankerende 3'- og 5'-utranslaterede områder afsluttet af EcoRI-sammenkædede oligonukleotidsegmenter. HBV-DNA-segmentet blev genisoleret ved præparativ gelelektroforese, elektroelueret og opdelt i prøver, som blev nedbrudt med exonukleasen Bal-31 i forskellige tidsrum fra 0,5 - 30 minutter ved 37 °C. Graden af exonukleasenedbrydning blev karakteriseret kvalitativt ved nedbrydning af en del af hver prøve med XbaI-endonuklease. S-protein-kodningsområdet indeholder et XbaI-sted begyndende 92 basepar fra første base af startcodonen. Derfor giver prøver, hvori Bal-31 nedbrydning var gået ud over XbaI-stedet, kun ét fragment ved gelelektroforese efter inkubering med XbaI-endonuklease, mens prøver med færre baser fjernet ville give to fragmentklasser: et homogent stort fragment og et heterogent lille fragment. Prøver givende kun ét XbaI-fragment blev bortkastet. Prøver, der gav fragmenter med to størrelsesgrupper, blev gjort stump-endet ved inkubering med DNA-polymerase I (Klenow-fragment, se H. Klenow et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 65, 168 (1970) i nærværelse af alle fire deoxynukleotid-triphosphater. Linker-oligonukleotider indeholdende EcoRI-genkendelsesstedet blev sat til ved stump-ende ligering under anvendelse af T4 DNA-ligase. EcoRI-specifikke kohæsive ender blev dannet ved nedbrydning med EcoRI-endonuklease. Det modificerede DNA blev isoleret ved gelelektroforese, elektroelueret og knyttet til EcoRI-nedbrudt, alkalisk phosphatase-behandlet pBR322, i en DNA-ligasekatalyseret reaktion. Rekombinantplasmiderne blev derpå anvendt til at transformere E. coli HB-101.

Der blev anvendt to strategier til frasortering og karakterisering af kloner med forkortede 5'-utranslaterede segmenter. I den første blev individuelle kolonier sorteret for tilstedeværelsen af S-protein-kodningsområde ved

in situ koloni-hybridisering under anvendelse af mærket S-protein-kodende DNA som sonde. Kolonier, der blev fraserteret positivt for tilstedeværelsen af S-proteinkodningsområde, blev anvendt til at starte kulturer, hvorfra vektor-DNA blev fremstillet. Vektor-DNA blev inkuberet med EcoRI-endonuklease for at udskære S-proteinkodningsregionen. S-protein-kodnings-DNA fremstillet på denne måde blev analyseret enten ved bestemmelse af størrelsen af dannede fragmenter ved XbaI-endonukleasenedbrydning eller ved DNA-sekvensanalyse af de 5'-terminale sekvenser (A. Maxam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977)).

En anden sorteringsstrategi blev anvendt til detektering af kloner, hvori det 5'-utranslaterede område var blevet fuldstændig fjernet eller afsluttet én base før startcodonen. Metoden udnyttede den iagttagelse, at de første fire baser i S-proteinkodningssekvensen, ATGG, når de knyttes sammen til et EcoRI-linker-oligonukleotid (GGAATTCC) dannede et genkendelsessted for restriktionsendonukleasen NcoI: CCATGG. NcoI-stedet, der dannes på denne måde, ville være enestående i vektoren, da hverken pBR322 eller S-proteinkodningsområdet indeholder et NcoI-sted. Derfor ville ethvert S-proteinkodningssegment, hvori Bal-31-nedbrydningen var afsluttet præcis ved ATG-startcodonen, være karakteriseret ved dannelsen af et nyt NcoI-sted, når det blev knyttet til et EcoRI-linker-oligonukleotid. I HBV-DNA er der tilfældigvis en C-rest ved siden af ATG-startcodonen i S-protein-regionen, i den 5'-utranslaterede region. Derfor vil Bal-31-nedbrydninger, der kun bevarer det sidste carbonatom i den 5'-utranslaterede region, også danne et NcoI-genkendelsessted, når det knyttes til et EcoRI-linker-oligonukleotid. Disse to specifikke konstruktioner blev fraserteret ved inkubering af klonerne med en kombination af NcoI- og XbaI-endonukleaser efterfulgt af gelelektroforese af de dannede fragmenter, hvis der var nogen. De kloner, der

gav et 96 basepar-fragment, blev derfor udvalgt, da de havde alle eller alle på nær én af de 5'-utranslaterede baser fjernet, men bibeholdt ATG-startcodonen. Den nøjagtige sekvens blev derpå bekræftet ved DNA-sekvensanalyse under anvendelse af proceduren efter Maxam et al. Det resulterende plasmid, der kombinerede pBR322 med et modificeret HBV-segment med hele den 5'-utranslaterede region af S-protein-genet fjernet, indsat ved EcoRI-stedet, blev betegnet pHBS5-3. (Se fig. 4). HBV-DNA-segmentet i pHBS5-3 blev også tilfældigt modificeret ved fjernelse af ca. 40 basepar fra den 3'-utranslaterede region på grund af ledsagende påvirkning af Bal-31 exonuklease ved 3'-enden.

Udtrykkelsesvektorkonstruktion analog med pHBS16, beskrevet i eksempel 2, blev udført ved indsætning af det modificerede HBV-DNA-segment i pHBS5-3 i stedet for det tilsvarende segment i pHBS16. Til dette formål blev der fremstillet en vektor af "16-typen" ved nedbrydning med EcoRI-endonuklease og religering efterfulgt af valg af en vektor, hvori HBV-DNA blev fjernet. Udtrykkelsesvektorer konstrueret ved indsætning af modificerede HBV-DNA-segmenter ved EcoRI-stedet i vektortype 16 blev karakteriseret ved betegnelsen pHBS16-X, hvor X er et tal, der karakteriserer modifikationen af HBV-DNA indsat ved EcoRI-stedet. Således dannede HBV-DNA-segmentet overført fra pHBS5-3 til 16-vektoren et udtrykkelsesplasmid betegnet pHBS16-3. (Se fig. 4). Alle konstruktioner blev undersøgt for korrekt orientering af S-protein-kodningsregionen med hensyn til ADH1-promoterens ved kombineret nedbrydning med BamHI- og XbaI-endonuklease. Korrekt orientering gav et Bam-Xba-fragment med en længde på ca. 1600 basepar, hvorimod ukorrekt orientering gav et længere fragment.

Værtsstammen for 16-serie-udtrykkelsesvektorerne var *Saccharomyces cerevisiae* AB 35-D3-D a, leu2-3, leu2-112,

ura3-52, trp1-289, his4-580, ade2 eller *Saccharomyces cerevisiae* AB 35-14-D. Prøvekulturer for værtsstammen transformeret med enten pHBS16 eller pHBS16-3 blev dyrket under ækvivalente betingelser, og Y-HBsAg blev prøvet
5 kvalitativt ved radioimmunprøve som beskrevet i eksempel 3. Celler transformeret med pHBS16-3 gav ca. 2,2 gange så meget Y-HBsAg pr. celle som de transformeret med pHBS16.

EKSEMPEL 5

10

Der blev foretaget en yderligere modifikation af den vektorkonstruktion, der er beskrevet i eksempel 4, i hvilken den 3'-utranslaterede region fjernet ved Bal-31-nedbrydning blev genskabt. Strategien ved denne konstruktion var
15 at kombinere, ved XbaI-stedet inde i S-protein-kodningsregionen, et fragment af den kodningsregion, der er afledt fra pHBS5-3, modificeret som beskrevet i eksempel 4, sammen med et umodificeret fragment fra pHBS5 med en intakt 3'-utranslateret region.

20

HBV-DNA-segmenterne af pHBS5 indeholdende den 5'-utranslaterede region og den promoter-proximale del af S-protein-kodningsregionen blev fjernet ved sekventiel indvirkning af ClaI-endonuklease og XbaI-endonuklease. Plasmidet blev først spaltet med ClaI-endonuklease. De resulterende uparrede ender blev udfyldt under anvendelse af
25 DNA-polymerase I Klenow-fragment i nærværelse af fire deoxynukleotid-triphosphater til tilvejebringelse af en lineær vektor med stumpe ender. DNA blev derpå nedbrudt med XbaI-endonuklease og alkalisk phosphatase. Sidstnævnte behandling var beregnet til at sikre, at de ved foregående række trin dannede ender ikke kun genforenes med hinanden i nærværelse af DNA-ligase (J. Shine, supra).

35

Modificeret HBV-DNA af pHBS5-3 indeholdende den promoter-proximale del af kodningsregionen for S-protein blev også

fremstillet ved sekventiel endonuklease-nedbrydning. Plasmid pHBS5-3 blev først spaltet med EcoRI-endonuklease og gjort stump-endet ved DNA-polymerase I Klenow-fragment i nærværelse af fire deoxynukleotid-triphosphater. DNA blev derpå spaltet med Xba-endonuklease. Det lille fragment, der dannedes ved XbaI-spaltning (ca. 100 basepar) med en stump EcoRI-ende og en XbaI-ende, blev isoleret ved gelelektroforese og elektroeluering. Formålet med sekventiel endonuklease-behandling i begge tilfælde var at sikre, at fragmentet med de 100 basepar ville blive tilknyttet i korrekt orientering med den spaltede vektor DNA. Fragmentet på 100 basepar afledt fra pHBS5-3 blev blandet med modificeret vektor DNA afledt fra pHBS5 i nærværelse af DNA-ligase under betingelser, der tillod stump-endet binding eller ligering såvel som sammenknytning af parrede ender afledt fra XbaI-snittene. Transformanter blev valgt og identificeret ved eksistensen af et NcoI-sted afledt fra det lille fragment fra pHBS5-3 (se eksempel 4).

Det forventedes, at EcoRI-stedet ved siden af NcoI-stedet ville regenereres ved den anvendte konstruktionsstrategi. Et basepar i det udfyldte EcoRI-sted blev imidlertid ikke regenereret af DNA-polymerasebehandlingen. Følgelig var EcoRI-stedet ikke regenereret som ventet. De gensamlede sekvenser gendannede imidlertid tilfældigvis ClaI-stedet.

DNA-nukleotidsekvensanalyse af den resulterende vektor, betegnet pHBS6, afbildet i fig. 4, bekræftede, at HBV-DNA-regionen af vektoren indeholdt hele S-protein-kodningsregionen og den 3'-utranslaterede region sammen med en deletion af den 5'-utranslaterede region som beskrevet for pHBS5-3. HBV-DNA-segmentet modificeret som pHBS6 blev overført til en udtrykkelsesvektor for 16-serien som følger: HBV-DNA-regionen i pHBS6 blev isoleret ved kombineret indvirkning af NcoI- og EcoRI-endonukleaser og gjort stump-endet ved inkubering med DNA-polymerase I

Klenow-fragment i nærværelse af fire deoxynukleotid-triphosphater. Det resulterende 820 basepar-fragment blev isoleret ved gelelektroforese og elektroeluering. Udtrykkelsesvektoren pHBS16 eller "16-vektoren" som beskrevet i eksempel 4 blev spaltet ved EcoRI-endonukleasepåvirkning, gjort stump-endet under anvendelse af DNA-polymerase I Klenow-fragment i nærværelse af de fire deoxynukleotid-triphosphater og behandlet med alkalisk phosphatase. HBV-DNA-fragmentet blev derpå knyttet til den behandlede 16-vektor ved stump-endeligering under anvendelse af T4 DNA-ligase. Korrekt orientering af fragmenterne gendannede et EcoRI-sted mellem ADH-promoterens og startcodonen i S-protein-kodningsregionen. DNA-nukleotidsekvensanalyse blev udført og bekræftede strukturen af den resulterende konstruktion, betegnet pHBS16-5, afbildet i fig. 5.

Den relative udtrykkelseshastighed for Y-HBsAg for gær-celler transformeret med pHBS16-5 blev målt under samme betingelser som for pHBS16-3, beskrevet i eksempel 4. Udtrykkelse af Y-HBsAg med *Saccharomyces cerevisiae* AB-35-D3-D transformeret med pHBS16-5 var ca. 2,8 gange større pr. celle som målt ved radioimmunprøve end udtrykkelse med celler transformeret med pHBS16.

En beslægtet konstruktion under anvendelse af HBV-DNA-segmentet af pHB56 blev udført under anvendelse af en identisk procedure med undtagelse af, at HBV-DNA-fragmentet blev fjernet eller udskåret med et EcoRI-endonukleasepræparat med nogen EcoRI* aktivitet. Efter ligering med 16-vektoren, fremstillet som tidligere beskrevet, viste udtrykkelsesvektoren sig at have mistet EcoRI-stedet såvel som NcoI-stedet ved siden af ATG-startcodonen i S-protein-kodningsområdet. Det resulterende udtrykkelsesplasmid blev betegnet pHBS16-4. Nukleotidsekvensen ved siden af S-protein-startcodonen var 5'...ACTATCTGGCATGG...3'. Udtrykkelsesgraden i gær-celler transformeret med pHBS16-4 var sammenlignelig med graden

for pHBS16-5-transformerede celler, inden for den eksperimentelle nøjagtighed. Strukturen af pHBS16-4 er afbildet i fig. 5.

- 5 Nukleotidsekvensen ved siden af S-protein-startcodonen af PHBS-16-3 var 5'...ACTATCTGGAATTCCCATGG...3'. Sekvensen for pHBS-16-5 var 5'...ACTATCTGGAATTCATGG...3'. Sekvensdifferencen mellem 16-3 og 16-5 var en følge af afstumpning af DNAet efter EcoRI-nedbrydning af pHBS-6.

10

EKSEMPEL 6

15 Dette eksempel beskriver detaljer ved konstruktionen af en række vektorer til udtrykkelse karakteriseret ved at have hele DNA-sekvensen for 2-mikron-cirkel-plasmidet i deres sekvens sammen med DNA-segmenter omfattende promoter- og transkriptionsterminatorsekvenserne for gær-ADH-genet, med S-protein-kodningsregionen sandwichlagt mellem ADH-promoter- og ADH-terminatorregionerne. Disse vektorer blev betegnet som "56"-serie-vektorer, og deres nomenklatur er i overensstemmelse med nomenklaturen for 16-serien af udtrykkelsesvektorer. Således indeholder udtrykkelsesvektoren pHBS16-3 S-protein-genet modificeret som beskrevet for pHBS16-3, mens pHBS56-5 indeholder HBV-DNA modificeret som beskrevet for pHBS16-5, som beskrevet i eksempel 4 og 5. 2-mikron-cirkel-DNA giver i sin fulde længde stabil replikation i en cirkel nul værtsstamme i fravær af metabolisk selektionstryk. ADH-terminatoren blev tilvejebragt for at forbedre stabiliteten af S-protein-mRNA-transkripterne.

20

25

30

Forældreplasmidet for konstruktion af vektorer af 56-typen var pCl/1, som var et hybridplasmid mellem pBR-322 og et 2-mikron-cirkelplasmid knyttet sammen ved deres EcoRI-steder. 2-mikron-cirkeldelen var forud modificeret til at indeholde et indsat LEU2-gen af gær og opnået fra plasmidet pJBD219 beskrevet af Beggs, J. et al., Nature

35

275, 104 (1978). Restriktionskortet for pCl/1 er vist på fig. 6.

Det kan ses fra fig. 6, at nedbrydning af pCl/1 med endo-
5 nuklease SphI slettede en del af plasmidet strækkende sig
over 2-mikron-pBR-322 samlingen. Det blev observeret, at
den aktive del af ADH1-promoterregionen var indeholdt i
et SphI-HindIII-fragment med en længde på ca. 300 basepar
(se sekvens af ADH1-genet, af J.L. Bennetzen og B.D.
10 Hall, J. Biol. Chem. 257, 301 (1982)). Genkendelses-
sekvensen for SphI er GCATGC, og en sådan sekvens findes i
ADH-promoterens begyndende ved stilling -413. På lignende
måde var gær-terminatorsekvensen indeholdt i et HindIII-
SphI-fragment på ca. 330 basepar. I begge tilfælde var
15 SphI-stedet distalt til kodningsregionen, således at HBV
S-protein-kodningsregionen kunne indsættes mellem dem,
hvis den tilvejebragtes med HindIII-steder i enderne.
Prækursorkilden for ADH-promoter- og -terminatorsegmen-
terne var plasmid pAAH5 indeholdende et 1500 basepar
20 ADH1-promoterfragment afsluttet ved stilling -9 i nukleo-
tidsekvensen (R.A. Hitzeman et al., supra), og en ca. 450
basepar terminatorhed fra nukleotid 913 til 1368 i ADH-
gennukleotidsekvensen, forbundet ved et HindIII-sted mel-
lem fragmenterne og klonet i BamHI-stedet af vektoren
25 YEp13 (J. Broach og J. Hicks, Gene 8, 121 (1979)). HBV-
DNA-segmenterne af pHBS5 blev fjernet ved EcoRI-nedbryd-
ning. De udstående ender blev udfyldt ved anvendelse af
DNA-polymerase I Klenow-fragment og knyttet sammen ved de
to ender med HindIII linker-oligonukleotider med sekven-
30 sen CAAGCTTG. Efter HindIII-endonuklease-nedbrydning for
at blotlægge uparrede HindIII-specifikke ender på HBV-
DNA-segmentet blev segmentet knyttet til HindIII-frak-
tionsplasmid pAAH5, hvorved HBV S-protein-kodningssekven-
sen blev anbragt mellem ADH-promoter- og -terminatorfrag-
35 menterne. Et plasmid med S-proteingenet i korrekt orien-
tering med hensyn til promoter- og -terminatorfragmen-
terne som bestemt ved restriktionsanalyse blev betegnet

pHBS-22. ADH-promoter- og -terminatorsekvenserne blev hver fundet at indeholde et SphI-sted (genkendelsessekvens GCATGC), hvilket gjorde det muligt at fjerne hele det sammensatte gen omfattende ca. 400 basepar af ADH1-promoter, HBV S-proteinregion og ca. 330 basepar af ADH1-terminator ved nedbrydning med SphI-endonuklease. Nedbrydning af pHBS22 med SphI-endonuklease gav det intakte sammensatte gen i et fragment på ca. 1500 basepar. Fragmentet blev sammenknyttet med SphI-skåret vektor pC1/1. E. coli HB101 transformanter blev undersøgt for ampicillin-resistens og følsomhed for tetracyclin, da det segment, der blev udskåret ved SphI-endonuklease-nedbrydning af pC1/1, fjernede en del af tetracyclinresistensgenet for pBR322-segmentet. Strukturen af den resulterende vektor, betegnet pHBS56, blev yderligere bekræftet ved restriktionsanalyse. E. coli HB101 transformanter opnået fra produkterne af ligasereaktionen blev klonet på plader indeholdende ampicillin. Plasmid DNA fra enkeltkolonisolater dyrket i kultur blev ved restriktionsendonukleaseanalyse undersøgt for indsætningen og korrekt orientering af S-protein-kodningsregionen. Det valgte plasmid pHBS-56 indeholdende HBV S-protein-kodningsregionen i korrekt orientering med hensyn til ADH-promoter- og -terminatorsegmenterne er vist på fig. 6.

To yderligere vektorer af 56-typen blev konstrueret under anvendelse af et promoterfragment og promoter-proximalregionen af S-protein-kodningssegmentet opnået fra pHBS16-3 og fra pHBS16-5. Disse konstruktioner blev betegnet pHBS56-3 og pHBS56-5. I begge tilfælde blev et SphI-XbaI-fragment ved en DNA-ligasekatalyseret reaktion forbundet med det større af de to SphI-XbaI-fragmenter opnået ved nedbrydning af pHBS56. Det større fragment på ca. 1080 basepar strækker sig fra XbaI-stedet i S-protein-kodningsregionen til SphI-stedet i ADH-terminatorregionen. Dette fragment blev isoleret ved gelelektroforese og elektroeluering før tilknytning til SphI-XbaI-fragmentet

af enten pHBS16-3 eller pHBS16-5 i en DNA-ligasekatalyseret reaktion. De to sammensatte gener, der således blev konstrueret, var identiske med undtagelse af sekvensen af den 5'-utranslaterede region mellem ADH-promoterens og S-protein-startcodonen, hvilke forskelle skyldtes forskelle i kildevektorerne, pHBS16-3 og pHBS16-5. Begge sammensatte gener blev subklonet, i adskilte reaktioner, ved SphI-stedet af pBR322 beliggende mellem BamHI-stedet og SalI-stedet af pBR322, til opnåelse af større mængder sammensat gen DNA. Subkloningsvektorerne blev valgt ud fra deres evne til at give ampicillin-resistens- og tetracyclin-sensitivitet-fænotype til E. coli HB101 transformanter.

I det sidste trin blev det store fragment fremstillet ved SphI-spaltning af pHBS56 behandlet med alkalisk phosphatase og isoleret ved gelelektroforese og elektroeluering. Tilsvarende blev de sammensatte gener fjernet fra deres subkloningsvektorer ved SphI-spaltning og isoleret ved gelelektroforese og elektroeluering, men uden phosphatasebehandling. De blev i separate reaktioner kombineret med det store SphI-fragment fra pHBS56 og samlet i DNA-ligasekatalyserede reaktioner givende pHBS56-3 og pHBS56-5. E. coli HB101 transformanter blev valgt ved ampicillin-resistens og tetracyclin-sensitivitet og yderligere karakteriseret ved restriktionsanalyse. Et diagram over konstruktionstrinene og kort over de relevante vektorer er vist i fig. 7. Skønt nomenklaturen for vektorer af 56-typen svarer til nomenklaturen for vektorer af 16-typen, vil det forstås, at forskellene i tilfælde af 56-serievektorer kun refererer til den 5'-utranslaterede region i hvert tilfælde, og at den 3'-utranslaterede region er den samme i hvert medlem af serien. Specifikt mangler pHBS56-3 den 40 basepars deletion i den 3'-utranslaterede region, som forekommer i pHBS16-3.

Efter kloningsselektion og karakterisering blev vektorer af 56-serien anvendt til at transformere en cirkel nul gærstamme betegnet 2150-2-3. Stammen blev afledt fra en genetisk krydsning mellem stamme Y379-5-D cyh2 nibl (rho⁻) (D. Livingston, Genetics 86, 73 (1977)) og DC 04 a AdeI AdeX leu2-04 (cir⁰) (J. Broach, Cell 21, 501 (1980)). Den diploide stamme, der dannes fra krydsningen, fik lov at sporulere, og der blev udskåret tetrader ved en standardprocedure. En af de haploide sporer var årsag til dannelsen af stamme 2150-2-3 a AdeI Leu2-04 (cir⁰). Gærtransformanter blev valgt for Leu⁺-fænotype tilført ved tilstedeværelse af plasmider af pHBS-56-serien.

De relative grader af Y-HBsAg-udtrykkelse i forskellige plasmid-vært-kombinationer blev sammenlignet på følgende måde. En liter cellekultur blev dyrket til dets begrænsende celletæthed, cellerne blev høstet i rå lysater, analyseret for totalt opløseligt protein og for Y-HBsAg under anvendelse af radioimmunprøve som beskrevet supra. Resultaterne blev udtrykt både som mikrogram Y-HBsAg pr. liter kultur og Y-HBsAg som vægt-% af det totale opløselige gærprotein. Sidstnævnte giver et mål for mængden af cellemetabolisme på grund af Y-HBsAg-produktion, mens førstnævnte giver et mål for det totale udbytte af Y-HBsAg opnåeligt ved vækst af kulturer til begrænsende tæthed. Forskelle forekommer især i tilfælde af 56-serievektorer, fordi de celler, der bærer disse vektorer, kan dyrkes i rige medier uden selektionstryk, hvorimod 16- og 25-serie-vektorerne kræver vækst i et defineret medium uden tryptophan til undgåelse af akkumulering af utransformerede segreganter. Resultaterne er vist i den efterfølgende tabel. Vægtmængderne af Y-HBsAg angivet i tabellen blev bestemt ved en tilgængelig radioimmunprøve under anvendelse af antistof dannet mod HBsAg. Derfor kan de mængder Y-HBsAg, der er rapporteret, ikke være et absolut mål for masse, men kan betragtes som værende indadtil konsistent til sammenligningsformål.

Y-HBsAg-udbytter

	Vektor pHBS-	Vært	Kultur- tæthed O.D. 660	Total gærop- løselig pro- tein, vægt-%	Y-HBsAg µg pr. li- ter kultur
5	16-3	AB-35-14D	2,0	0,1	20
	16-4	AB-35-14D	2,0	0,1	20
	16-5	AB-35-14D	2,0	0,1	20
	25	GN-3C-2	4,0	0,5	200
10	56	2150-2-3	12,0	0,3	300

EKSEMPEL 7

15 Fremstilling af en vaccine omfattende HBsAg syntetiseret med gær.

Y-HBsAg-partikler renses fra celleekstrakter ved metoden ifølge eksempel 3 eller ved egnede metoder, der er kendt i teknikken, f.eks. som beskrevet i US patentskrifterne nr. 4 088 748 eller 4 181 713. Rensede HBsAg-partikler dialyseres mod fysiologisk saltvand eller phosphatpufret saltvand og indstilles til 100 µg protein/ml slutkoncentration. Marsvin underkastes subcutant med mellemrum på 20 9, 14 og 56 dage 1 ml af HBsAg-præparatet. Serum fra testdyrene indsamles på dagene 0, 28, 56 og 84 og prøves for antistoftiter mod Dane-partikler eller HBsAg renses fra Alexander-celler. Radioimmunprøven beskrevet i eksempel 3 anvendes, eller også radioimmunprøven af F. Hollinger et al., J. Immunol. 107, 1099 (1971). Størstedelen af 25 dyrene udviser antistoffer, der er krydsreaktive med HBsAg 84 dage efter administrering af partiklerne. Lignende resultater opnås efter injektion i aber. Følgelig er det ved hjælp af gær syntetiserede HBsAg immunogent og 30 i stand til at udløse antistoffer, der er krydsreaktive med naturligt forekommende HBsAg. 35

HBsAg syntetiseret med gær har den fordel, at det er tilgængeligt i betydeligt større mængder end opnåelige fra Dane-partikler eller bærerserum. Der kan opnås et mere ensartet produkt ved en fordelagtig omkostning pr. enhed, som kan forventes at falde med stigende produktion. Endvidere er der ingen fare for tilfældig infektion, da der ikke er noget intakt HBV og ikke kan være noget HBV i det overfladeantigen, der er fremstillet ud fra gær. I modsætning hertil er der ved virale proteiner rensset fra serum eller andre naturlige kilder altid fare for viral forurening.

EKSEMPEL 8

Som vist i eksempel 7 er HBsAg syntetiseret med gær i stand til at fremkalde antistoffer, der er krydsreaktive med naturligt forekommende HBsAg. Deraf følger, at sådanne antigener og antigen-aggregater, når de renses som beskrevet og administreres i et fysiologisk acceptabelt medium, udgør en vaccine til beskyttelse mod infektion mod hepatitis B virus.

Seksten chimpanse blev opdelt i tre grupper. Gruppe A (seks dyr) inokuleres intravenøst med 1 ml af et standard Hepatitis B viruspræparat fra Bureau of Biologics; gruppe B (fire dyr) inokuleres intravenøst med 1 ml indeholdende 200 µg HBsAg syntetiseret i gær og rensset som beskrevet i eksempel 3, i fysiologisk saltvand; gruppe C (seks dyr) er kontrolgruppen og modtager ingen inokulering. Alle chimpanse i gruppe A har tegn på klinisk hepatitis B (enten antigenemia, enzymforøgelse og/eller antistofrespons) i løbet af 40 uger. Ingen af dyrene i gruppe B eller C udviser tegn på klinisk hepatitis B infektion i løbet af samme 40 ugers periode. Chimpanserne fra gruppe B gøres immune for efterfølgende smitte, når de inokuleres intravenøst med 1,0 ml BOB hepatitis B virus.

EKSEMPEL 9

- Y-HBsAg afveg i adskillige henseender fra plasma-afledt HBsAg. Diametrene af HBsAg og Y-HBsAg partikler blev målt fra negativt fremkaldte eller farvede elektronmikrografer. Det gær-afledte antigen havde et diameterinterval på ca. 14 til ca. 18 nm, medens plasma-afledt antigen havde et diameterområde på ca. 20 til ca. 24 nm.
- Y-HBsAg var ustabil ved pH 2 og mod pepsin ved pH 2, hvorimod plasma-afledt HBsAg var stabilt under samme betingelser. Til 1 ml suspension af rensat Y-HBsAg blev der sat 0,03 ml 1 N HCl for at nedsætte pH til 2,0. Prøven blev halveret, og til den ene halvdel blev der sat 1 µg pepsin, medens der ikke blev sat noget pepsin til den anden halvdel. Begge prøver blev holdt ved 37 °C i 16 timer, og derpå blev der tilsat 0,03 ml 1 N NaOH til hver for at forøge pH til 7,0. De to prøver blev målt for antigenbindende aktivitet i et kvantitativt radioimmuno-forsøg (RIA). Over 95% af RIA-aktiviteten blev tabt i hver prøve. Under samme betingelser opretholdt det fra plasma afledte HBsAg hele sin antigenbindende aktivitet.
- En prøve af rensat Y-HBsAg blev opvarmet i natriumdodecylsulfat (SDS) og 2-mercaptoethanol ved 90 °C i 5 minutter. Den blev derpå elektroforoseret gennem en 10%'s polyacrylamidgel indeholdende 0,1% SDS. Efterfølgende farvning af gelen med proteinfarvestof afslørede et enkelt bånd ved en molekylvægtækvivalens-lokation på ca. 25000. En prøve af rensat HBsAg fra plasma behandlet på samme måde udviste to bånd efter farvning: ét bånd ved ca. 25000 Dalton og et andet bånd ved ca. 28000 Dalton.
- Ulig plasma-afledt HBsAg bandt Y-HBsAg ikke til et monoklonalt antistof (HBsAb) valgt mod HBsAg. Et rå ekstrakt af gærceller indeholdende overfladeantigen blev passeret gennem en affinitetsadsorberende søjle fremstillet ved

kemisk kobling af monoklonalt HBsAb til en agarosegel. Måling af søjleeffluentet afslørede, at 90% af Y-HBsAg, der blev sat til søjlen, var til stede i effluentet. Et plasma-afledt HBsAg passeret gennem samme søjle af monoklonalt HBsAb afslørede mindre end 10% af det til søjlen tilførte antigen i effluentet.

Y-HBsAg udviste højere aktivitet i muse-styrkeforsøg. Y-HBsAg blev adsorberet til en aluminiumhydroxidgel før administrering og blev fortyndet til at indeholde 10, 2,5, 0,62, 0,15 og 0,0375 $\mu\text{g/ml}$. Portioner på 1 ml af de forannævnte koncentrationer blev injiceret intraperitonealt i hver af fem grupper på 4 uger gamle hunmus. Hver af disse koncentrationer blev anvendt til injektion i en af de fem grupper, hvor hver gruppe indeholdt ti mus. Det gær-producerede antigen havde en ED_{50} -værdi på ca. 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (hvilken værdi står for koncentrationen af antigen, der behøves til at danne antistof i halvdelen af musene), medens plasma-afledt antigen ved samme procedure havde en ED_{50} -værdi på ca. 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Y-HBsAg renses som beskrevet var i alt væsentligt frit for kontaminerende kemikalier. Måling af Lowry-proteinet i Y-HBsAg viste 53 $\mu\text{g/ml}$, medens måling af RIA-antigenbindingsevnen for dette antigen indikerede en koncentration på 12 $\mu\text{g/ml}$. Måling af Lowry-proteinet og RIA-antigenbindingsevnen for et rent præparat af plasma-afledt HBsAg afslørede en proteinkoncentration på 44 $\mu\text{g/ml}$ og en bindingsaktivitet på 50 $\mu\text{g/ml}$.

Der blev ikke iagttaget nogen forskel i de fysiske, kemiske eller antigene egenskaber for Y-HBsAg fremstillet ud fra celler transformeret med pHBS-16, -25 eller -52.

35

EKSEMPEL 10Sammenlignende studie af styrke i mus for gær-afledt antigen med plasma-afledt antigen.

5

Ialt firs 5 uger gamle hunmus blev opdelt i to grupper på hver fyrre, og hver gruppe blev yderligere underopdelt i fire undergrupper på ti mus. De ti mus fra hver undergruppe blev injiceret intraperitonealt med enten det antigen, der blev fremstillet ifølge eksempel 3 under anvendelse af vektor pHBS-25, eller plasma-afledt antigen i en koncentration på henholdsvis 10, 2,5, 0,625 eller 0,156 μ g/ml. Saltvand/alun-placebo blev anvendt som fortyndingsmiddel til fortynding af antigenkoncentrationen, hvor det var nødvendigt for at opnå de førnævnte koncentrationer. Musene blev individuelt tappet for blod og slået ihjel efter 28 dages forløb. Antistofbestemmelser blev foretaget ved Ausab (Abbott) radioimmun-prøve. De serologiske egenskaber er samlet i efterfølgende tabel, hvor titere er udtrykt som "skønnede Ausab-enheder".

25

30

35

Gruppe	Materiale	Konc. (μ /ml)	Sero- overføring	Anti-HBs-titer skønnede Ausab-enheder
5	I gær-afledt antigen	10 (RIA)	10/10	5400, 7200, 800, 13 500, 7200, 183, 800, 136 000, 15 800, 23 500
10	II	2,5	10/10	18 300, 5400, 800, 7200, 5400, 800, 5400, 1600, 135 000, 72
10	III	0,625	8/10	800, 8, 1600, 16 000, 158 000, 1600, 3600, 8, 8, 8000
15	IV	0,125	8/10	8, 800, 800, 32 200, 5400, 8, 112 000, 18 300, 477, 412
20	V plasma- afledt antigen	10 (Lowry)	9/10	292 000, 20 800, 8, 38 200, 16, 16, 13 500, 36, 54, 512
20	VI	2,5	10/10	36, 38 200, 15,800, 800, 800, 800, 7200, 18 300, 208, 15 800
25	VII	0,625	4/9	8, 8, 8, 800, 512, 512, 8, 158, 8
25	VIII	0,125	0/10	8, 8, 8, 8, 8 8, 8, 8, 8, 8
30				
35				

EKSEMPEL 11Sammenlignende studie af styrke i afrikanske grønne aber for gær-afledt antigen med plasma-afledt antigen.

5

Ialt 32 afrikanske grønne aber blev opdelt i to grupper på 16, og hver gruppe blev yderligere opdelt i fire undergrupper på 4 aber. Hver undergruppe blev injiceret intramuskulært på dag 0 og dag 28 med gær-afledt antigen eller plasma-afledt antigen med en koncentration på 10, 2,5, 0,625 eller 0,156 $\mu\text{g/ml}$ under anvendelse af saltvand/alun-placebo som fortyndingsmiddel til fortynding af antigenkoncentrationen, hvor det er nødvendigt til opnåelse af nævnte koncentrationer. Blod blev opsamlet med ugentlige intervaller i 14 uger, og antistofbestemmelser blev foretaget ved Ausab (Abbott) radioimmunprøven med titere udtrykt som "skønnede Ausab-enheder". Resultaterne er samlet i de følgende tabeller.

20

25

30

35

Dyr nr.	Konc. (µg/ml) RIA)	(Gar-alun)											
		Tid/uge/skønnede Ausab-enheder											
		-1	0*	2	4*	6	8	10	12	14			
V-80015	10	<8	<8	54	36	322	5400	3600	1600	2350			
79144	10	<8	<8	920	112	135	292	5120	20.800	20.200			
79147	10	<8	<8	72	72	135	4120	13.500	29.200	26.200			
80012	10	<8	<8	512	208	135	208	3520	2620	47.700			
V-80006	2,5	<8	<8	512	352	3220	36.000	54.000	72.000	16.000			
79148	2,5	<8	<8	512	112	92	112	92	135	512			
80009	2,5	<8	<8	382	112	158	183	5120	29.200	32.200			
80016	2,5	<8	<8	720	262	5120	800	20.800	18.300	23.500			
V-80185	0,625	<8	<8	183	412	5120	8000	16.000	20.800	20.800			
80192	0,625	<8	<8	7200	158	92	158	5120	18.300	11.200			
80193	0,625	<8	<8	5400	352	5120	16.000	13.500	18.300	26.200			
80201	0,625	<8	<8	183	112	112	92	112	235	442			
V-80181	0,156	<8	<8	512	352	2920	5400	1600	1350	1350			
80178	0,156	<8	<8	477	262	158	92	92	412	5120			
80180	0,156	<8	<8	<8	<8	5400	1600	360	360	720			
80175	0,156	<8	<8	<8	302	3220	920	360	360	360			

* Inokulat - 1,0 ml i.m. på dag 0, 4 uger

Følgende plasmider og transformerede gærstammer blev deponeret i American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

	<u>Beskrivelse</u>	<u>Deponeringsdato</u>	<u>Deponeringsnr</u>
5	1. Plasmid pHBS-16	4. august 1981	40043
	2. <i>S. cerevisiae</i> XV610-8C/pHBS-16	4. august 1981	20619
10	3. Plasmid pHBS56	7. juli 1982	40047
	4. Plasmid pHBS16-3	7. juli 1982	40048
15	5. <i>S. cerevisiae</i> AB35-14D/pHBS16-3	7. juli 1982	20647
	6. <i>S. cerevisiae</i> AB35-14D/pHBS16-4	7. juli 1982	20646
20	7. <i>S. cerevisiae</i> 2150-2-3/pHBS56	7. juli 1982	20648
	8. Plasmid pHBS16-4	7. juli 1982	40046
25	9. Plasmid pHBS16-5	7. juli 1982	40045
	10. <i>S. cerevisiae</i> AB35-14D/pHBS16-5	7. juli 1982	20645
30	11. Plasmid pHBS56-3	14. juli 1982	40051
	12. Plasmid pHBS56-5	14. juli 1982	40052
	13. <i>S. cerevisiae</i> 2150-2-3/pHBS56-3	14. juli 1982	20649
35	14. <i>S. cerevisiae</i> 2150-2-3/pHBS56-5	14. juli 1982	20650

Deponeringsstedet blev bedt om at behandle de ovennævnte deponerede organismer i overensstemmelse med bestemmelserne og betingelserne i Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes/Patent Procedure.

P a t e n t k r a v :

10 Fremgangsmåde til fremstilling af et antistof mod HBsAg, k e n d e t e g n e t ved, at man immuniserer et dyr med Hepatitis B virus HBV-fri HBsAg syntetiseret i gær og renses HBV-frit antistof fra dyrets serum.

15

20

25

30

35

FIG. 1

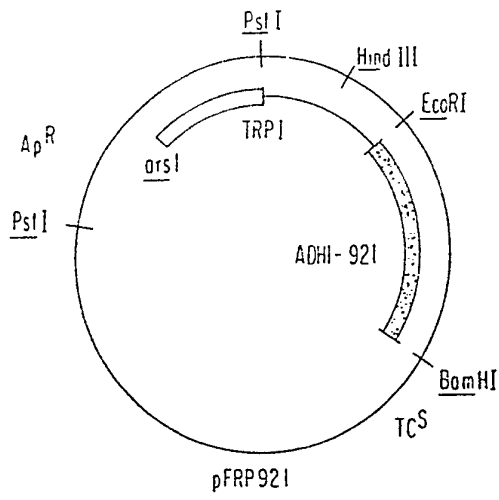


FIG. 3

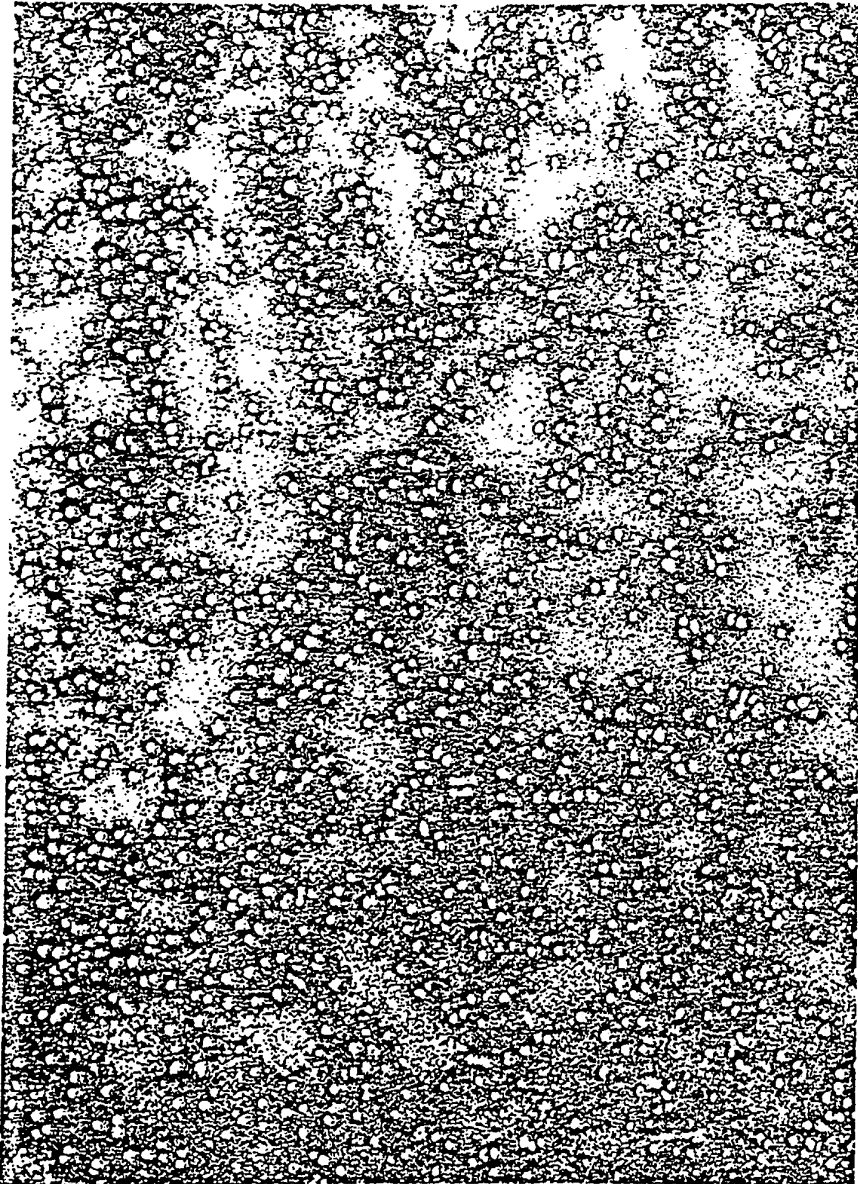
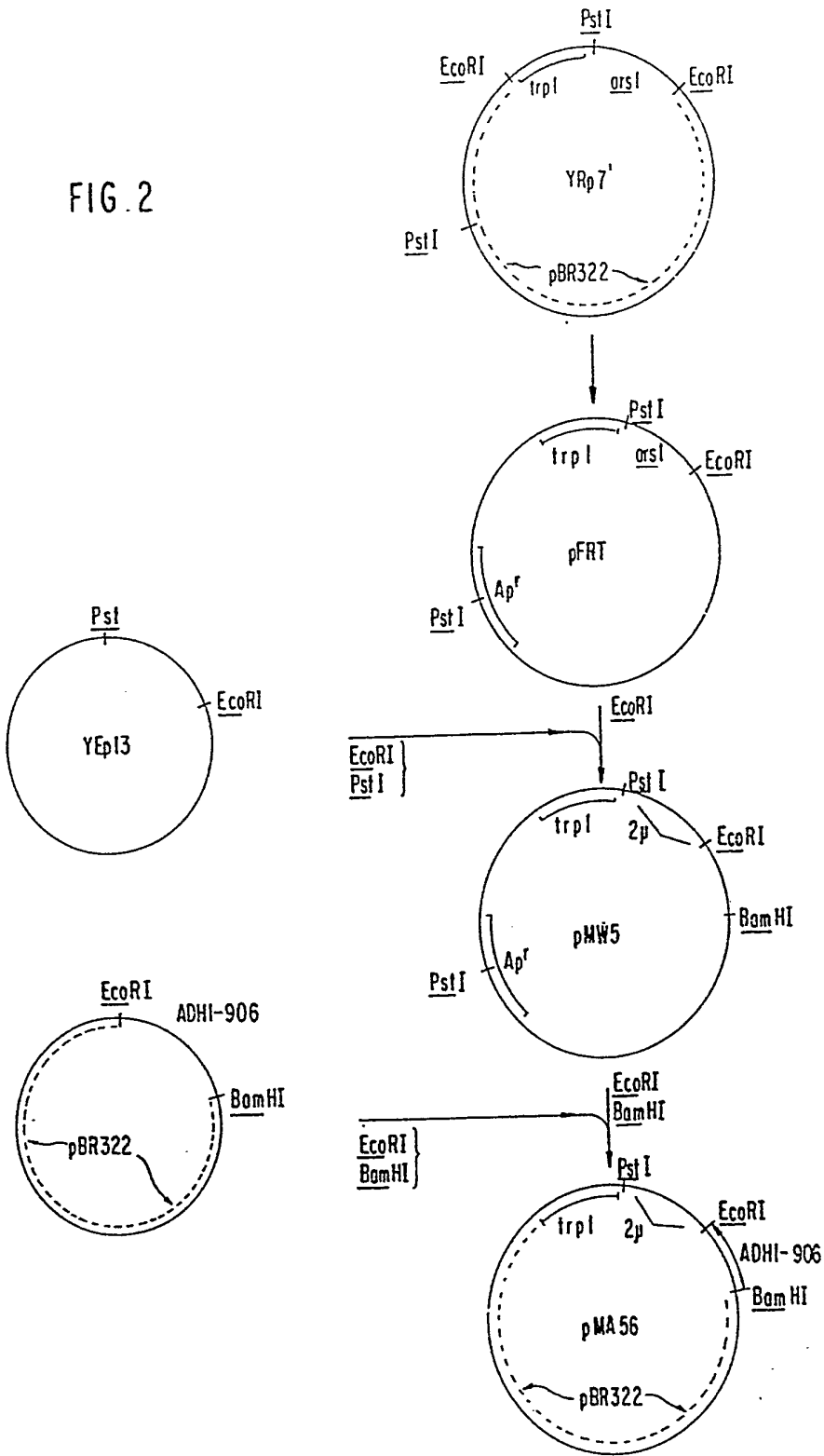


FIG. 2



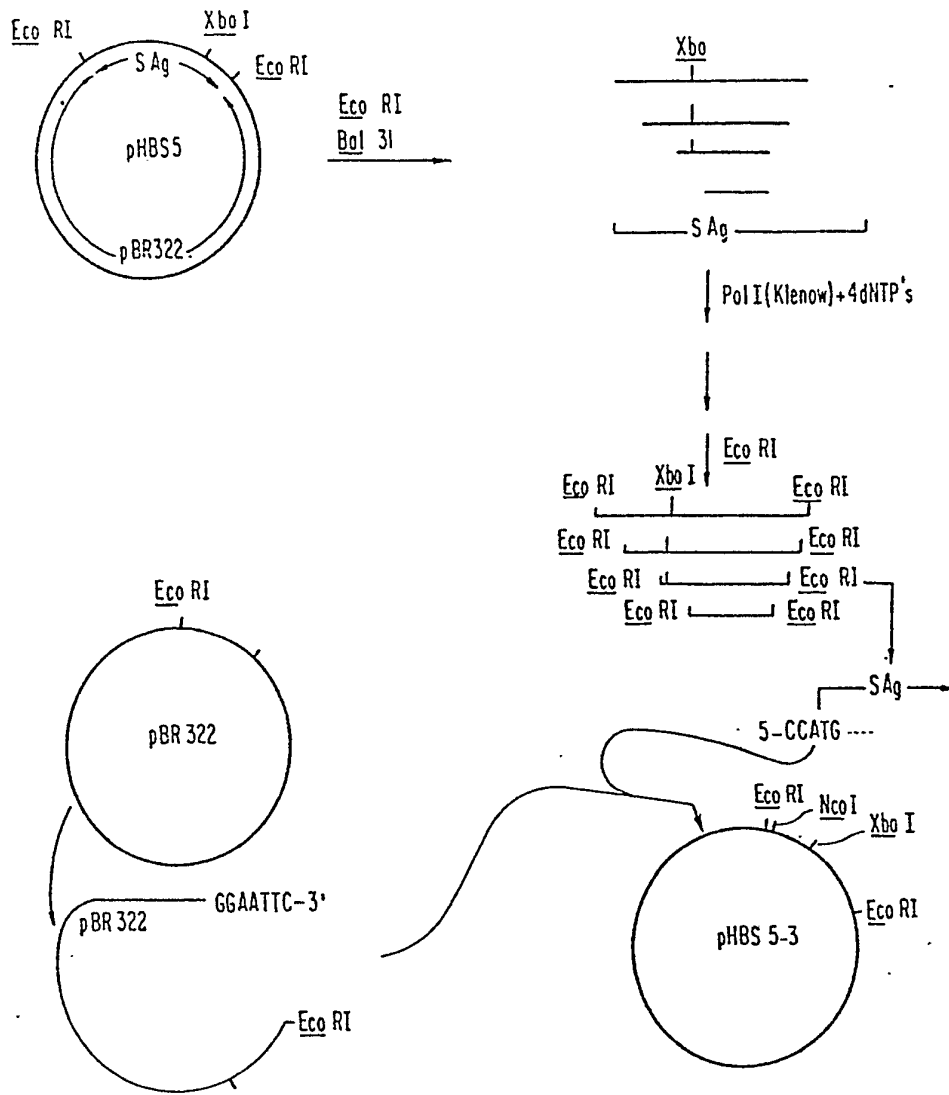
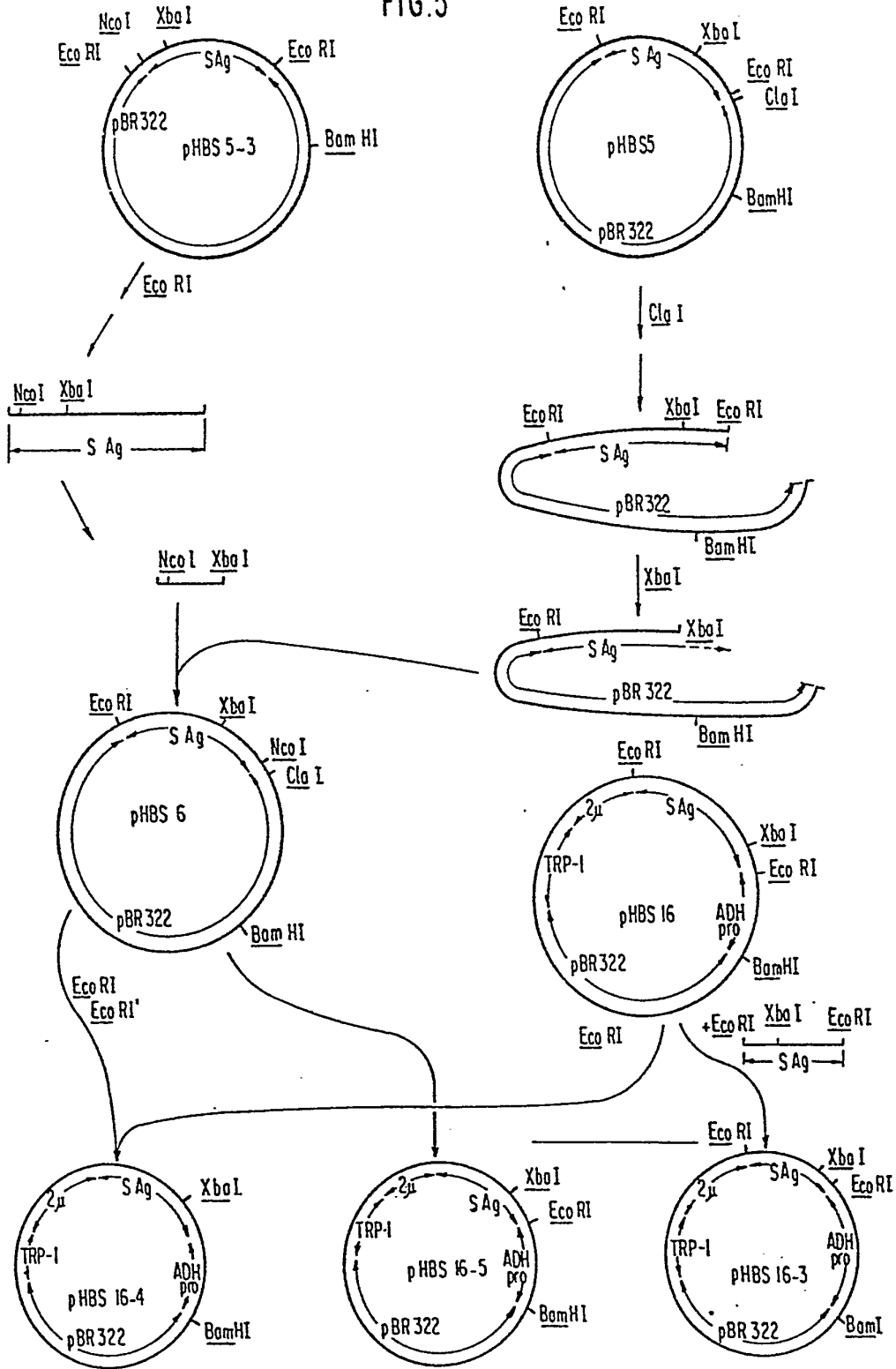


FIG. 4

FIG. 5



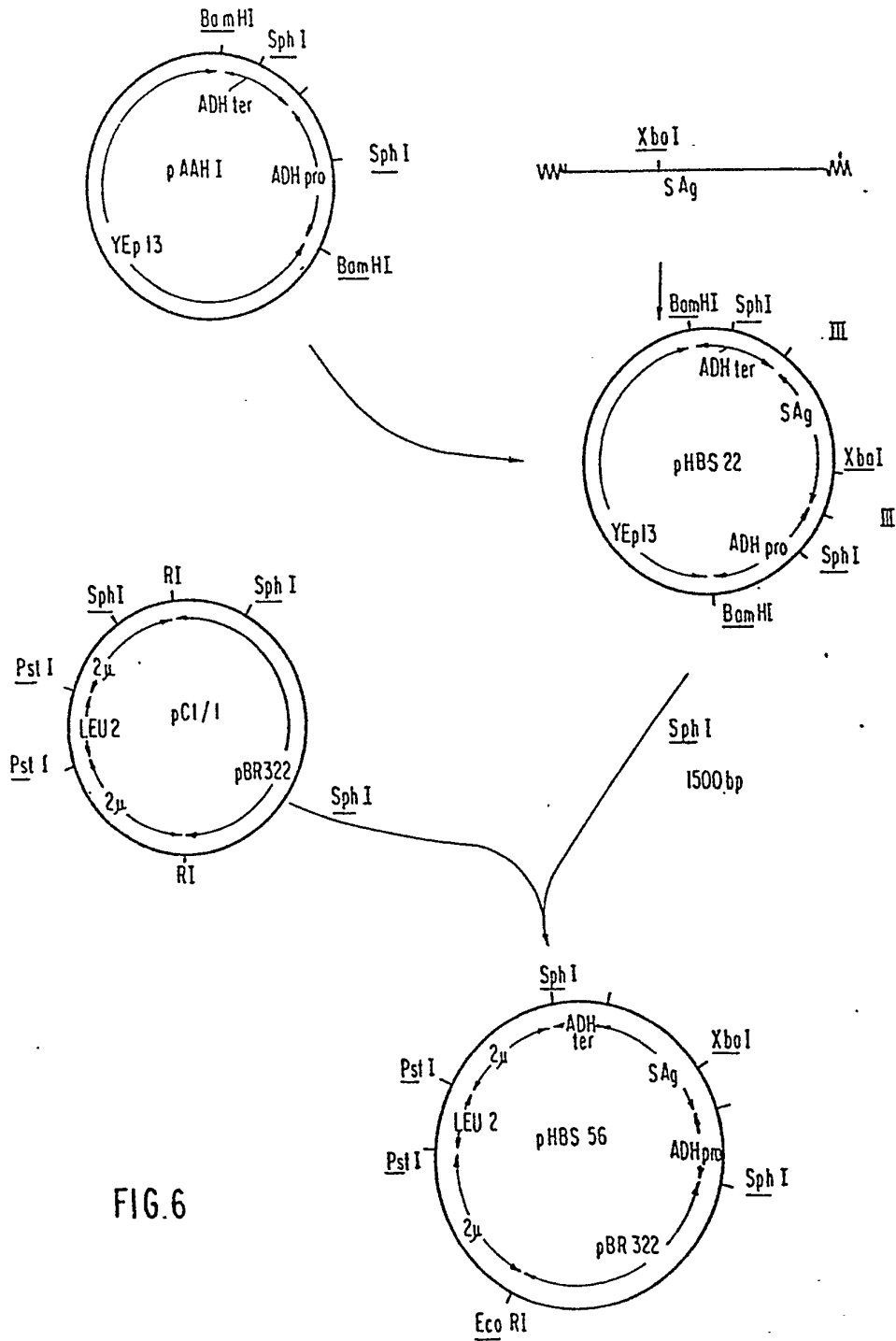


FIG. 6

FIG. 7

