

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.⁸: **C 12 N 15/86** **C 12 N 15/20**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1985 02823**

(22) Indleveringsdag: **1985-06-21**

(24) Løbedag: **1985-06-21**

(41) Alm. tilgængelig: **1985-12-22**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **1999-12-06**

(30) Prioritet: **1984-06-21 JP 128215/84**

(73) Patenthaver: **Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 14-10, Nihonbashi 3-chome,, Chuo-ku, Tokyo, Japan**

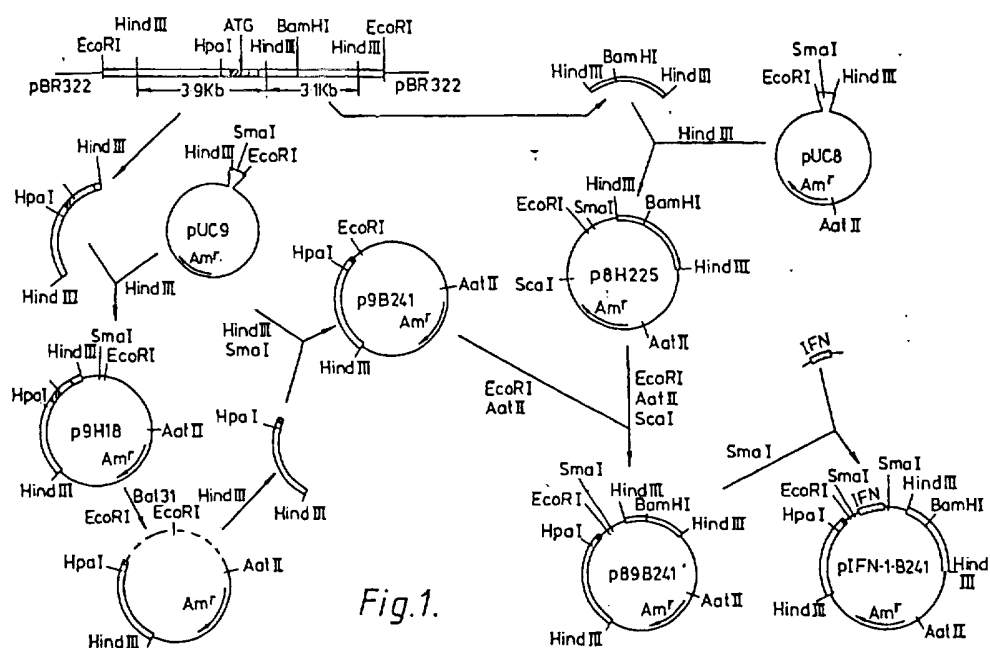
(72) Opfinder: **Susumu Maeda, RC 2-103, Tottoridaigaku-shukusha, 4-chome, Koyamanishi, Tottorishi,, Tottori, Japan**
Mitsuru Furusawa, c/o Daiichi Seiyaku Research Institute, 16-13, Kitakasai 1-chome,, Edogawaku, Tokyo, Japan

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider ved genteknik, rekombinant BmNPV-DNA og vektor, der er anvendelig ved fremgangsmåden**

(56) Fremdragne publikationer:
Mol. Cell. Biol. 3, 2156-2165 (1983)

(57) Sammendrag:
En fremgangsmåde til fremstilling af nyttige stoffer bestående i, at der i dyrkede celler eller i en vært formeres et rekombinant Bombyx mori nucleart polyhedrosis-virus (BmNPV)-DNA. BmNPV-DNA'et fremstilles ved rekombination med et dobbeltstrenget DNA indeholdende (i) et 5'-opstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle gen, der koder for fremstillingen af polyhedralt protein, og også inkluderende promotor-regionen for det strukturelle gen, (ii) en translationel start-codon og (iii) et gen, der koder for fremstilling af et nyttigt stof exogent for virus'et, med eller uden (iv) et 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende nedstrøms fra det strukturelle gen, der koder for fremstillingen af polyhedralt protein.



Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider (herunder proteiner og glycoproteiner), der er anvendelige for eksempel som lægemidler, under anvendelse af genteknik, 5 ved hvilken fremgangsmåde sådanne polypeptider fremstilles mere effektivt end ved konventionelle fremgangsmåder. Nærmere angivet angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af sådanne polypeptider in vitro eller in vivo under anvendelse af et viralt 10 DNA, herunder fremstilling af forskellige nyttige polypeptider effektivt in vivo i silkeorme (*Bombyx mori*) under anvendelse af et nucleart polyhedrosis-virus. Opfindelsen angår også rekombinant BmNPV-DNA og en vektor, der er anvendelig ved fremgangsmåden ifølge 15 opfindelsen.

Der er rapporteret en række fremgangsmåder til fremstilling af nyttige stoffer i *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* osv., under anvendelse af plasmider og lignende og under udnyttelse 20 af rekombinant DNA-teknik.

Der findes også en rapport, der beskriver et forsøg på at fremstille β -interferon og β -galactosidase i dyrkede celler (af en etableret cellelinie af *Spodoptera frugiperda*) ved anvendelse af viralt DNA (Auto- 25 *grapha californica* nucleart polyhedrosis virus-DNA) efter strukturelt gen-substitution der, G.E. Smith et al., *Molecular and Cellular Biology*, 3 (12), 2156-2165 (1983), G.D. Pennock et al., *ibid.*, 4 (3), 399-406 (1984). Fra førstnævnte artikel (Smith et al.) må det 30 således betragtes som kendt, at man kan udtrykke et

heterologt gen ved hjælp af opstrøms sekvenser (incl. promotor) fra et *Autographa californica* nucleart polyhedrosis virus' polyhedrale protein. Det er imidlertid et problem, at *A. californica*, der skal anvendes til udøvelse af denne fremgangsmåde, er en i naturen forekommende skadelig organisme. Denne fremgangsmåde er derfor og på grund af for lav proteinproduktion ikke tilfredsstillende som en fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider. De foreliggende opfindere har foretaget undersøgelser med det sigte at tilvejebringe en forbedret fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider, hvilket har ført til den foreliggende opfindelse, ifølge hvilken der anvendes opstrøms sekvenser fra det beslægtede *Bombyx mori* nucleart polyhedrosis virus' polyhedrale protein med en forøget proteinproduktion til følge, navnlig ved anvendelse af levende silkeorme, som det er blevet eftervist ved sammenlignende forsøg.

Ifølge opfindelsen tilvejebringes der således en fremgangsmåde til effektiv fremstilling af nyttige polypeptider, såsom proteiner eller glycoproteiner, ved genteknik under anvendelse af DNA'et fra *Bombyx mori* nucleart polyhedrosis-virus (i det følgende forkortet BmNPV), nemlig under udnyttelse af funktionen af en promotor-region i BmNPV-DNA'et.

Fremgangsmåde ifølge opfindelsen til fremstilling af nyttige polypeptider er ejendommelig ved, at der i dyrkede celler eller i en anden egnet værtsorganisme opformeres et rekombinant *Bombyx mori* nucleart polyhedrosis-virus (BmNPV)-DNA, der er fremstillet ved

rekombination med et dobbeltstrenget DNA indeholdende (i) et 5'-opstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein, og også inkluderende
5 promotor-regionen for nævnte strukturelle gen, (ii) en translationel start-codon og (iii) et gen, der koder for et nyttigt polypeptid exogent for nævnte virus, med eller uden (iv) et 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende nedstrøms fra nævnte struk-
10 turelle gen, der koder for polyhedralt protein.

En hensigtsmæssig udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at det rekombinante BmNPV-DNA opformerer i en etableret cellelinie fra Bombyx mori eller i levende silkeorme.

15 Opfindelsen angår også rekombinant BmNVP-DNA, der er ejendommeligt ved, at det er fremstillet ved rekombination med et dobbeltstrenget DNA indeholdende (i) et 5'-opstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle gen, der koder for
20 polyhedralt protein, og også inkluderende promotorregionen for nævnte strukturelle gen, (ii) en translationel start-codon og (iii) et gen, der koder for et nyttigt polypeptid exogent for nævnte virus, med eller uden et 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt
25 forekommende nedstrøms fra nævnte strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein.

Opfindelsen angår som indledningsvis nævnt også en vektor, der er anvendelig ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvilken vektor er ejendommelig ved, at den
30 indeholder (i) et 5'-opstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle

gen, der koder for polyhedralt protein, og stadig inkluderende promotor-regionen for nævnte strukturelle gen, (ii) (a) en translationel start-codon og (b) et gen for et nyttigt peptid exogent for nævnte virus, og
5 (iii) et 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende nedstrøms fra nævnte strukturelle gen.

Ifølge et særligt aspekt af opfindelsen tilvejebringes der en fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider, hvilken fremgangsmåde er ejen-
10 dommelig ved, at den omfatter

- udskæring fra Bombyx mori nucleart polyhedrosis-virus(BmNPV)-DNA af (a) det strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein, sammen med en 5'-opstrøms-del opstrøms fra nævnte strukturelle gen og også inklu-
15 derende promotor-regionen for nævnte strukturelle gen og (b) en 3'-nedstrøms-del nedstrøms fra nævnte strukturelle gen,

- indføring af (c) et gen, der koder for et nyttigt stof exogent for nævnte virus, i stedet for den
20 strukturelle gen-del af det vundne DNA-fragment,

- insertion af substitutionsproduktet i en vektor,
- indføring af det således fremstillede rekombinante DNA for overføring kombineret med BmNPV-DNA'et i celler eller en vært til transfektion, og

- 25 - opformering af det resulterende rekombinante BmNPV-DNA.

En udførelsesform for det rekombinante BmNPV-DNA ifølge opfindelsen er et rekombinant BmNPV-DNA, der er ejendommeligt ved, at det er fremstillet ved rekombi-
30 nation under anvendelse af et gen, der koder for et nyttigt polypeptid exogent for nævnte BmNPV-DNA, som et heterologt gen, og en udførelsesform herfor er et rekombinant BmNPV-DNA, der er ejendommeligt ved, at

rekombinationen omfatter substitution af nævnte heterologe gen i genregionen for polyhedralt protein i nævnte BmNPV-DNA eller insertion i en anden region af nævnte BmNPV-DNA.

- 5 Opfindelsen angår endelig en fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider ved genteknik, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der anvendes (a) en 5'-opstrøms BmNPV-DNA-del oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle gen, der
10 koder for polyhedralt protein, og også inkluderende promotor-regionen for nævnte strukturelle gen og (b) en 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-del oprindeligt forekommende nedstrøms fra nævnte strukturelle gen.

- 15 I det følgende henvises til tegningerne, på hvilke Fig. 1 viser konstruktionen af et pIFN-1B-rækkeplasmid, der er anvendeligt til fremstilling af rekombinant BmNPV-DNA,

- 20 Fig. 2 viser et restriktionsenzymkort for EcoRI-EcoRI-fragmentet af pBmE36,

- 25 Fig. 3 viser base-sekvensen af en del af HpaI-HindIII-fragmentet,

Fig. 4 viser base-sekvensen i nærheden af ATG'et af det polyhedrale gen,

Fig. 5 viser en skitse over linker-syntese,

- 30 Fig. 6 illustrerer en fremgangsmåde til fremstilling af pBM030,

Fig. 7 viser et restriktionsenzymkort for pBM030 visende base-sekvens af polylinker-regionen deraf og restriktionsenzym-kløvningssteder deri,

Fig. 8 illustrerer en fremgangsmåde til fremstilling af pIFN 2 BN-række-plasmider, og

Fig. 9 illustrerer en fremgangsmåde til fremstilling af pBMO34.

- 5 Opfindelsen vil i det følgende blive beskrevet nærmere gennem typiske udførelsesformer for opfindelsen.

BmNPV er et af de insekt-vira, der hører til baculovirus-gruppen.

- Det har høj vært-specificitet og inficerer
- 10 silkeormen (*Bombyx mori*) med akkumulering af polyhedralt protein i store mængder i dens celler. Dette virus har et dobbeltstrenget cirkulært DNA-genom på ca. 140 kbp, og dette DNA kan vindes fra virale partikler ved anvendelse af konventionel teknik, for eksempel ved
- 15 protease-behandling, natriumlaurylsulfat (SDS)-behandling, osv. og ekstraktion, osv., som beskrevet i G.E.Smith og M.D.Summers, *Virology*, 89, 517-527 (1978). Dette dobbeltstrengede cirkulære DNA (i det følgende kort omtalt som viralt DNA eller BmNPV-DNA) er et temmeligt
- 20 stort cirkulært DNA. Det er derfor at foretrække til brug at vælge et mindre DNA-fragment indeholdende det strukturelle gen for polyhedralt protein og dele før og efter genet (5'-opstrøms- og 3'-nedstrøms-delen) blandt DNA-fragmenter, der dannes ved restriktionsenzym-be-
- 25 handling. Forskellige restriktionsenzymer kendes og er tilgængelige på markedet. Valg af et eller flere passende enzymer til ovennævnte formål er derfor let, og passende anvendelsesbetingelser kan vælges i afhængighed af det eller de anvendte enzymer, som beskrevet i T.Maniatis,
- 30 E.F.Fritsch, J. Sambrook, *Molecular Cloning* (i det følgende *Mol.Clon.*), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, side 97-148. Syntese (kemisk syntese, kløvning med restriktionsenzym eller -enzymer), separation og påvisning af DNA-fragmenter, analyse af DNA-sekvenser og behandling
- 35 af *Escherichia coli*, osv. (transformation, dyrkning, plasmidudvinding, osv.) involveret i den teknologiske

del af den foreliggende opfindelse kan gennemføres under anvendelse af velkendt genteknik, som beskrevet i A.D.Riggs og K.Itakura, Am. J. Hum. Genet., 31, 531-538 (1979) og Mol.Clon.

- 5 Ved valg af et DNA-fragment indeholdende en strukturel gen-del blandt et antal DNA-fragmenter fremstillet ud fra BmNPV-DNA, kan Southern-hybridisering (Mol. Clon., side 382-389) under anvendelse af en probe fremstillet på konventionel måde blandt andet anvendes.
- 10 Det fragment, der skal vælges, skal indeholde den strukturelle gen-del, men det der er afgørende er, at fragmentet også indeholder en temmeligt lang DNA-kæde på 5'-siden (opstrøms-siden) og i nogle tilfælde også en sådan DNA-kæde på 3'-siden (nedstrøms-siden). Længden
- 15 af hver kæde er af betydning i forbindelse med effektiviteten af produktionen af det ønskede nyttige stof. Selvom let håndtering også er en faktor af betydning, som nærmere omtalt nedenfor, kan det bestemmes eksperimentelt, om en given kædelængde er passende eller ej.
- 20 Den passende kædelængde af DNA blev bestemt på følgende måde. Med DNA-fragmenter af forskellig længde blev der konstrueret rekombinant-vira indeholdende gen for produktion af et nyttigt stof, såsom α -IFN, som beskrevet i Eksempel 1. Derefter blev dyrkningsceller inficeret ..
- 25 med disse rekombinant-vira for at sammenligne produktiviteten af det nyttige stof. På basis af nedenstående beskrivelse, navnlig eksemplerne, vil fagmanden ikke møde alvorlige vanskeligheder ved gennemførelsen af forsøg, der er nødvendige i denne sammenhæng, selvom der kræves
- 30 nogen tid og arbejde. Selvom et fragment på ca. 10,6 kbp, der kan vindes ved kløvning med EcoRI (fremstillet af Takara Shuzo Co., Ltd.) er et af de til formålet egnede fragmenter, er forskellige fragmenter, f.eks. ClaI-ClaI, PstI-PstI osv., der kan vindes ved brug
- 35 af andre restriktionsenzymmer, også anvendelige. ClaI fremstilles af New England Biolabs, USA, og PstI fremstilles af Takara Shuzo Co., Ltd.

Der kan gøres effektiv brug af forskellige former

for teknik ved eliminering af den strukturelle gen-del fra et fragment indeholdende det strukturelle gen for polyhedralt protein med den forudgående og efterfølgende DNA-kæde og fjernelse med henblik på brug af en DNA-

5 kæde med en passende længde og indeholdende promotor-regionen på opstrøms-siden fra det strukturelle gen, og eventuelt en DNA-kæde med en passende længde og oprindeligt forekommende nedstrøms fra det strukturelle gen.

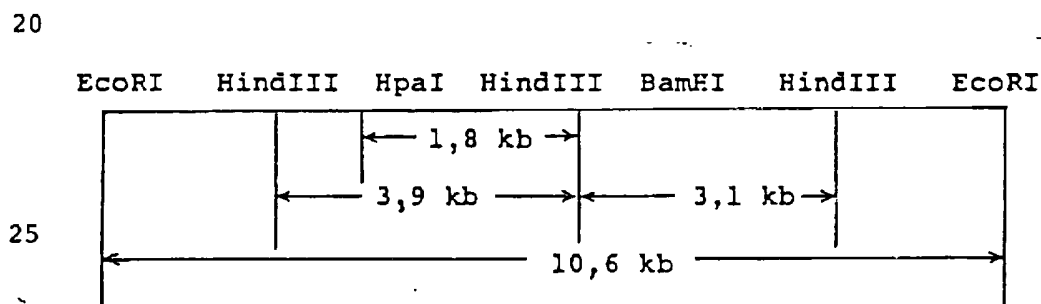
- 10 Fragmenter vundet ved anvendelse af forskellige restriktionsenzymmer undersøges således for deres DNA-sekvenser for derved at identificere den strukturelle gen-del, således at det strukturelle gen kan elimineres ved fordøjelse under anvendelse af exonuclease-enzym
- 15 (f.eks. ved fordøjelse med Bal31 eller exonuclease III). Opstrøms- og nedstrøms-DNA-kæden, der kræves, kan for eksempel fremstilles, som dele, der forbliver efter Bal31-fordøjelse eller ved restriktionsenzym-kløvning efter bestemmelse af de respektive DNA-sekvenser, eller
- 20 ved kemisk syntese som beskrevet i A.D.Riggs og K. Itakura, Am. J. Hum. Genet., 31, 531-538 (1979).

- Aminosyre-sekvensen af det polyhedrale protein fra BmNPV fremstillet i silkeormen er blevet analyseret og rapporteret at indeholde 244 aminosyrer, S.B.
- 25 Serebriani et al., [J.Invertebrate Pathology, 30 442-443 (1977)]. Det er derfor muligt, f.eks. ud fra aminosyre-sekvensen af det polyhedrale protein, at checke, til hvilken del af polyhedrin-genet et BmNPV-afledt DNA-fragment svarer, eller om fragmentet er fra en
- 30 anden del end genet, ved at bestemme fragmentets base-sekvens, konstruere en aminosyre-sekvens baseret på base-sekvensen ifølge codon-aminosyre-korrespondance-reglen og sammenligne den således opnåede aminosyre-sekvens med den af Serebryani et al., supra. rapporterede.
- 35 De foreliggende opfindere har påvist, at det til eliminering af polyhedrin-genet og til anvendelse af opstrøms- og nedstrøms-DNA-fragmenter er bedst egnet med et BmNPV-DNA-fragment (ca. 10,6 kbp), der kan vindes

ved EcoRI-kløvning, og at kløvning af fragmentet med HindIII (fremstillet af Takara Shuzo Co. Ltd.) giver to fragmenter, der er hensigtsmæssige at anvende. Fragmentet er imidlertid ikke det eneste, med hvilket opfindelsens formål kan opnås. Andre passende fragmenter, f.eks. kløvning-582, vundet ved screening under anvendelse af forskellige restriktionsenzymmer, kan anvendes.

I den følgende beskrivelse vil tilfældet med det ovennævnte egnede fragment blive benyttet til illustration, hvor egnet. DNA-sekvenserne osv. vil, med mindre andet er specificeret, blive angivet på konventionel måde. 5'-Enden er således anført på den venstre side og 3'-enden på den højre side, og et fragment fremkommet ved restriktionsenzym-kløvning er angivet ved en bindestreg mellem navnene på restriktionsenzymmerne. Også i dette tilfælde har venstre og højre samme betydninger som ovenfor nævnt.

Som eksempel er det ovennævnte EcoRI-EcoRI-fragment sammenfattet nedenfor.



Den gen-del, der koder for polyhedralt protein, kan påvises ved yderligere kløvning af det ovennævnte fragment til mindre fragmenter efterfulgt af screening deraf ved for eksempel Southern-hybridisering. I det ovennævnte tilfælde kunne således tilstedeværelsen af det omhandlede strukturelle gen bekræftes i et HpaI-HindIII-fragment (ca. 1,8 kb). HpaI fremstilles af Takara Shuzo Co., Ltd. Som reference er base-sekvensen af en del af HpaI-HindIII-fragmentet [fra basen ved 201 nedstrøms fra HpaI-kløvningsstedet til HindIII-kløv-

ningsstedet (1567 bp fra -382 til 1185 med reference til ATG-startstedet, heri det samme)] vist i Fig. 3. For anvendelsen af delene opstrøms og nedstrøms fra det strukturelle gen er det derfor hensigtsmæssigt at anvende to fragmenter, HindIII-HindIII-fragment (ca. 3,9 kb) og HindIII-HindIII-fragment (ca. 3,1 kb) fremstillet ved HindIII-behandling. Disse to fragmenter kan isoleres ved konventionelle metoder, såsom agarose-elektroforese, som beskrevet i Mol.Clon., side 164-167.

De to således isolerede fragmenter manipuleres hensigtsmæssigt ved separat at indføre deres fragmenter i plasmider indeholdende kunstige linkere. Kommercielt tilgængelige plasmider pUC9 og pUC8 (begge fra Pharmacia P-L Biochemicals) er for eksempel egnede til dette formål.

HindIII-HindIII-fragmentet (ca. 3,1 kb) fra nedstrømssiden anvendes ved at indsætte det i pUC8 ved dets HindIII-sted. HindIII-HindIII-fragmentet fra opstrømssiden, der indeholder genet for polyhedralt protein, indsættes i pUC9 ved dets HindIII-sted, insertionsproduktet kløves på ét sted med et restriktionsenzym (f.eks. EcoRI), og det således vundne DNA-fragment underkastes fordøjelse med Bal31 (fremstillet af Bethesda Research Laboratories, USA), hvorved DNA-kædelængden kan indstilles hensigtsmæssigt, da Bal31 fordøjer baserne én efter én fra begge ender af kløvningsstedet. Ved at fremstille flere fragmenter med forskellig længde ved at variere behandlingstiden og analysere dem for base-sekvens er det muligt at bestemme det nu for polyhedrin-genet frie fragment ud fra kendskabet til baseparrene i polyhedringen-DNA-sekvensen.

Efter eliminering af polyhedrin-genet på ovennævnte måde kan der vindes et DNA-fragment indeholdende den virus-afledte promotor-region opstrøms fra genet. Dette fragment er anvendeligt til fremstilling af et vektor-plasmid ved insertion af dette fragment, i kombination med et DNA-fragment nedstrøms fra polyhedrin-

genet, hvilket fragment også kan vindes ved den ovennævnte polyhedringen-eliminering, i nævnte rækkefølge i et plasmid, og yderligere til fremstilling af et rekombinant-plasmid ved derefter at indføre et exogent
5 gen for et nyttigt stof på stedet mellem de to fragmenter, hvilket er det sted, hvor polyhedrin-genet tidligere forelå.

For eksempel bliver opstrømsdelen, efter behandling med HindIII, indført i pUC9 til dannelse af
10 et plasmid, mens nedstrømsdelen indføres i form af et HindIII-HindIII-fragment (ca. 3,1 kb) i pUC8 ved HindIII-stedet til dannelse af et andet plasmid. Derefter bliver, under udnyttelse af restriktionsenzymsteder fælles for de to plasmider, et yderligere plasmid
15 konstrueret, der indeholder både opstrøms- og nedstrømsdelen, som om de var blevet indført i ét og samme plasmid. I dette tilfælde er det undertiden hensigtsmæssigt ved insertion af et gen for et nyttigt stof at konstruere
20 således, at en kunstig linkerdel foreligger mellem de to dele. Andre konventionelle metoder til DNA-sekvensinsertion i et plasmid kan også anvendes.

Hvor der findes udeladelser i eller omkring den translationelle start-codon for polyhedrin-genet og i og omkring den translationelle terminations-codon, kan
25 disse, ved sammenligning med den nedenfor anførte DNA-sekvens, fyldes ved supplerende addition af syntetiske DNA'er eller ved in vitro-mutagenese, som beskrevet i K. Itakura et al., Nucleic Acid Res., 9, side 3647-3156 (1981). Sådanne reparationer foretages under anvendelse af konventionel rekombinant-DNA-teknik, som
30 beskrevet i Mol.Clon.

Til fremstilling af nyttige stoffer er der rapporteret forskellige gener, og det er endvidere forventet, at isolering af mange naturlige gener og
35 syntese af sådanne og andre gener vil blive rapporteret fremover. Det er klart, at de alle kan anvendes ved praktiseringen af den foreliggende opfindelse. Nyttige stoffer omfatter biologisk aktivt materiale, f.eks.

peptider, proteiner og glycoproteiner, f.eks. lymfokiner, såsom α -interferon, β -interferon, γ -interferon, TNF og interleukiner, hormoner, såsom insulin og humant væksthormon, vacciner, såsom human hepatitis A og B, og

- 5 influenza-vacciner, og andre materialer, såsom TPA, somatomediner eller kolonistimulerende faktorer. I almindelighed kan den translationelle start-codon ATG forbindes til disse gener for nyttig stofproduktion forud for efterfølgende procestrin.

- 10 Et rekombinant-plasmid fremstilles derefter ved insertion af et gen for produktion af et nyttigt stof, med en polylinker, der indeholder restriktionssteder for EcoRI, SmaI, BamHI, SalI og PstI, forbundet til begge ender deraf, i vektoren eller ved en anden
- 15 passende, konventionel metode, som beskrevet i Mol. Clon., side 392-393. Det således vundne rekombinant-plasmid indeholder således de virus-afledte fragmenter, nemlig det promotor-regionholdige DNA-fragment og nedstrøms-DNA-fragmentet startende fra den translationelle
- 20 terminations-codon, henholdsvis opstrøms og nedstrøms fra det exogene gen for nyttig stofproduktion, såvel som det exogene gen. Ved de ovennævnte procestrin kan en reversering af base-sekvensen muligvis finde sted under DNA-fragment-insertionen. Det er derfor nødvendigt
- 25 i hvert trin, før der gøres videre med det næste trin, at få bekræftet, at base-sekvensen har den korrekte læse-retning.

- Det på ovennævnte måde vundne rekombinant-plasmid kan selv anvendes til transformationen af *Escherichia coli* og blive formeret deri.
- 30

- Det er ikke altid nødvendigt for 5'-opstrøms-fragmentet indeholdende promotor-regionen at bibeholde den i BmNPV-DNA'et oprindeligt forekommende base-sekvens. Lignende ekspressionshastighed kan forventes,
- 35 selvom fragmentet er blevet mere eller mindre modificeret.

Den typiske TATA-boks, der siges generelt at være til stede i promotor-regionen, kan ikke identi-

- ficeres bestemt i den del af BmNPV-DNA'et, der er opstrøms fra ATG i det strukturelle gen for polyhedralt protein. Som vist i Eksempel C-2 nedenfor og de efterfølgende eksempler samt i Tabel I, har imidlertid visse
- 5 mangler i opstrømmen fra ATG, nemlig udeladelser i -7 til -1 bp, -18 til -1 bp og -19 til -1 bp, ingen væsentlig indflydelse på den udmærkede effekt, der kan opnås uden sådanne udeladelser. Et tilfredsstillende resultat kan også opnås med udeladelse i -29 til -1 bp.
- 10 På den anden side resulterer udeladelse i -82 til -1 bp i en tendens til betydeligt reduceret effekt. Nabolaget for -80 basen fra ATG synes derfor allerede at inkludere en vigtig promotor-region. 5'-Opstrøms-DNA'et, der indeholder en kombination af promotor-regionen og
- 15 et for viral DNA-rekombination nyttigt opstrøms-DNA, kan være af variabel længde. Det kan for eksempel have en længde i området fra flere hundrede til ca. 10 kilobasepar, der ligger forud for ATG. Nærmere angivet giver, som nedenfor omtalt, anvendelsen af den del af
- 20 HpaI-HindIII-fragmentet på ca. 1,8 kb, der er opstrøms fra ATG, eller anvendelse af den del af HindIII-HindIII-fragmentet på ca. 3,9 kb, der er opstrøms fra ATG, eller af en del deraf, tilfredsstillende resultater. Det er øjensynligt ikke af væsentlig betydning, at 5'-
- 25 opstrøms-DNA'et indeholder en yderligere del opstrøms fra fragmentet på ca. 3,9 kb. Promotor-regionen er som allerede nævnt vigtig for en udmærket BmNPV-DNA-proteinproduktivitet, der skal udnyttes.

- DNA-sekvensen beliggende opstrøms fra promotor-regionen og 3'-nedstrøms DNA-sekvensen nedstrøms fra
- 30 det strukturelle gen for polyhedralt protein er vigtige som nøgler for produktionen af et rekombinant virus ved insertion af et gen, der koder for et nyttigt stof (med translationel start-codon for det exogene gen, der
- 35 koder for nyttigt stof), i BmNPV-DNA'et, som nedenfor beskrevet. Blandet infektion med BmNPV-DNA'et og et rekombinant DNA til overføring (f.eks. plasmid), der har et DNA-fragment indeholdende et gen, der koder for

et nyttigt stof, og, opstrøms og nedstrøms fra dette gen, DNA-sekvenser homologe med de respektive modparter i BmNPV-DNA'et, resulterer således i krydsskift og overføring af genet, der koder for nyttigt stof, til BmNPV-DNA'et som følge af homologien i nøgle-delene, hvorved
5 dannes et rekombinant BmNPV-DNA.

Bestemmelse, modificering og anvendelse af de respektive DNA-sekvenser i delene opstrøms og nedstrøms fra det strukturelle gen for polyhedralt protein er på
10 ingen måde vanskelige for fagmanden at udføre på baggrund af den ovenfor og i det følgende samt i eksemplerne givne beskrivelse. Fagmanden kan forstå og praktisere de relevante former for teknik, uanset hvor detaljerede de måtte være, på baggrund af alene rutineforsøg. Det
15 skal bemærkes, at enhver udførelsesform, der er praktiserbar på denne måde, falder inden for området af den foreliggende opfindelse.

Ved at anvende det ovennævnte rekombinant-plasmid kan forskellige fremgangsmåder anvendes til fremstilling af et rekombinant BmNPV-DNA indeholdende
20 det gen, der koder for nyttigt stof. For eksempel gennemføres én fremgangsmåde in vitro, og en anden benytter silkeormen. Ifølge en yderligere udførelsesform benyttes ikke et sådant rekombinant plasmid, men der
25 fremstilles en rekombinant mellem BmNPV-DNA'et og pBR322 eller lignende, og polyhedron-genet i rekombinanten erstattes med et gen, der koder for produktion af et nyttigt stof, for at fremstille et rekombinant viralt DNA.

30 In vitro blandet infektion af dyrkede celler, for eksempel celler af en etableret cellelinie (Bm-celler, der er beskrevet som BM-N-celler i L.E.Volkman og P.A.Goldsmith, Appl.Environ. Microbiol., 44, 227-233 (1982) eller Bm-celler deponeret hos ATCC under ATCC deponerings Nr. CRL-8851 fra Bombyx mori eller andre celler,
35 der er modtagelige for infektion med BmNPV, hvilket kan bestemmes ved visuel undersøgelse, cytopatiske effekter, osv., med BmNPV-DNA'et og et rekombinant

plasmid med et gen, der koder for produktion af et nyttigt stof, resulterer i krydsskift og overføring af det ønskelige gen (gen, der koder for produktion af nyttigt stof) til det virale DNA, hvorved dannes et re-

5 kombinant viralt DNA (rekombinant BmNPV-DNA). Denne rekombination opnås i nogle tilfælde ved indføring af det ønskelige gen i stedet for den strukturelle gen-region for polyhedralt protein, og i andre tilfælde ved yderligere indføring af ét eller flere gener for pro-

10 duktion af nyttigt stof i det virale DNA i én eller flere andre regioner deri. Sådan blandet infektion gennemført in vitro resulterer i formering af det rekombinante virale DNA og dermed i akkumulering af det ønskede nyttige stof. Mediet kan indeholde det ikke-

15 rekombinante såvel som det rekombinante virus, men det rekombinante virus kan isoleres på konventionel måde, for eksempel ved fortyndingsmetoden eller plaque-metoden, som beskrevet i H.A.Wood, J.Invertebr.Pathol., 29, 304-307 (1977), og S.Maeda, J.Seric.Sci.Jpn., 53,

20 547-548 (1984).

Den ovennævnte blandede infektion kan også gennemføres i silkeormen.

Ved at inficere Bm-celler in vitro med det i Bm-celler dyrkede virus (enten en blanding af rekombinant

25 og ikke-rekombinant virus eller det rekombinante virus isoleret derfra) eller injicere virus'et percutant i silkeormen eller i dens legemshulhed, kan det ønskede nyttige stof produceres effektivt. Endvidere kan silkeorm inficeres med virus'et gennem munden. Det nyttige

30 stof kan derefter isoleres og renses ved en passende, kendt metode, f.eks. ved affinitets-søjlechromatografi, ionbytter-chromatografi, molekularsigtning, osv.

Ifølge opfindelsen er det således muligt at fremstille nyttige peptider, proteiner og glyco-

35 proteiner sikkert og økonomisk i store mængder.

Ifølge opfindelsen fremstilles et peptid eller protein i eukaryotiske celler. Når der anvendes et gen stammende fra en eukaryot, kan peptidet eller proteinet

derfor undergå de samme modifikationer som dem, der foregår in vivo i eukaryoten, såsom signal-peptid-eliminering og sukkerkædeaddition, således at anvendeligheden af produkterne forventes at blive langt højere sammenlignet med de produkter, der kan vindes ved den konventionelle genteknik under anvendelse af bakterier. Endvidere kan disse produkter, da de udskilles fra cellerne, renses meget let, f.eks. ved affinitetschromatografi, ionbytter-chromatografi, molekularsigtning, osv.

Endvidere er der års erfaringer i opdræt af silkeorme og findes mængder af forsøgsresultater, således at silkeorm-dyrkning i stor målestok er let at gennemføre. Det er også blevet muligt at opdrætte silkeorme på kunstigt foder (f.eks. "Vita-Silk", et produkt fra Vita-Silk Co., Ltd., Nagoya, Japan). Produktionen af nyttige stoffer gennem den levende organisme under anvendelse af virale vektorer er derfor formodentligt langt bedre egnet til industrielle formål og mere økonomisk end produktionen af sådanne stoffer på celleniveau.

Opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempler, hvori der er beskrevet produktion af α -interferon (α -INF), et som lægemiddel anvendeligt protein, under anvendelse af α -INF-genet som genet for produktion af nyttigt stof.

Eksempel 1

A. Kloning og formering af BmNPV ved plaque-teknik.

Silkeorme Bombyx mori på det tredje stadium blev inficeret oralt med BmNPV. Flere dage senere blev legems-væsken indsamlet, fortyndet med TC-10 medium [J.Invertebrate Pathology, 25, 363-370 (1975)] indeholdende 1% foetalt kalveserum og anvendt til infektion af Bm-celler [en etableret cellelinie af Bombyx mori (der kan leveres af Dr. L.E.Volkman, University of California, Berkeley, ATCC Nr. CRL-1851), Appl. Environ.Microbiol., 44, 227-233 (1982)] dyrket i form

- af monolag. De inficerede celler blev udbredt som lag på TC-10 medium indeholdende 0,75% agarose og 5% foetalt kalveserum. Efter medium-størkning blev inkubation gennemført ved 27°C i flere dage. De på pladen dannede
- 5 plaque'er blev isoleret under anvendelse af en Pasteur-pipette. To gentagelser af denne plaque-teknikproces gav genetisk homogene virale isolater. Stammen BmNPV T3, typisk for disse virale isolater, anvendtes til det følgende forsøg.
- 10 Stammen T3 blev formeret i Bm-celler og derefter anvendt til percutan inokulation til infektion af silkeorme på femte stadium. Seks dage senere blev det inficerede væv indeholdende dannet polyhedra centrifugeret, med tilsætning af destilleret vand, og
- 15 sedimentet blev suspenderet i destilleret vand og tritureret. Polyhedra'et blev rensed ved fraktioneret centrifugering (3.000 rpm, 30 minutter) og diskontinueret vægtfyldegradient-centrifugering (45 og 55 vægt% sucroseopløsninger, 20.000 rpm, 30 minutter). Polyhedron-suspensionen blev underkastet fraktioneret centrifugering
- 20 til fjernelse af sucroseopløsning (3.000 rpm, 10 minutter), det rensede polyhedra blev suspenderet i 0,1M natriumcarbonat (pH 11)-0,05M natriumchlorid og behandlet ved 25°C i 30 minutter for at frigøre virale
- 25 partikler. Denne virale suspension blev underkastet 10 til 40 vægt% sucrosevægtfyldegradient-centrifugering (18.000 rpm, 30 minutter) til rensning. Sucrosen blev fjernet ved dialyse eller fraktioneret centrifugering (40.000 rpm, 30 minutter), hvorved vandtes rensede
- 30 virale partikler.
- B. Fremstilling af viralt DNA, identifikation af polyhedron-gen og kloning.
- B-1. Ekstraktion af viralt DNA.
- Til den således vundne virus-holdige opløsning
- 35 blev der sat SDS (natriumlaurylsulfat, 1 vægt%) og protease K (Merck, 1 mg/ml). Efter ca. 2 timers inkubation ved 37°C blev der til ovennævnte opløsning sat samme volumen af en phenolopløsning (mættet i

10mM Tris-hydrochlorid-puffer (pH 7,6)-1mM EDTA], og blandingen blev rystet forsigtigt i 5 minutter og derefter centrifugeret ved 12.000 rpm i 5 minutter. Det vandige lag blev udtaget, og samme phenol-behandling blev gentaget to gange. Til dette DNA-holdige vandige lag blev der sat samme volumen chloroform efterfulgt af forsigtig rystning af ca. 5 minutter og centrifugering ved 12.000 rpm i 2 minutter. Det vandige lag blev udtaget, samme chloroform-behandling blev gentaget to gange, og det vandige lag blev dialyseret mod 10mM tris-hydrochlorid-puffer (pH 7,6)-1mM EDTA i ca. 2 dage. Det herved vundne virale DNA (ATCC nr. 40188) anvendtes ved den efterfølgende gen-kloning og Bm-celle-transfektion.

15 B-2. Kloning af polyhedrin-gen.

Probe-fremstilling: Silkeorme på femte stadium blev inficeret percutant med stammen BmNPV T3. Flere dage senere blev helt RNA ekstraheret fra legems-fedt-vævet ved guanidinhydrochlorid-metoden og rensed ved anvendelse af en oligo(dT)-cellulosesøjle, hvorved vandtes et poly(A)-holdigt mRNA. Dette mRNA blev undersøgt under anvendelse af in vitro kanin-reticolyt-translationssystemet (Weissbach, H. og Ochoa, S., Ann.Rev. Biochem., 45, side 191, 1976), og det fandtes, at det polyhedrin-indkodende mRNA udgjorde 90% eller mere af det hele mRNA. Et cDNA blev syntetiseret under anvendelse af mRNA'et som "template", oligo(dT) som primer, og omvendt transcriptase som beskrevet i Mol. Clon., side 211-246. Ved denne lejlighed anvendtes ³²P-holdigt dCTP som substrat, og det således mærkede cDNA anvendtes som en probe til screening for polyhedrin-genet.

Kloning af polyhedringen-holdigt EcoRI-fragment:

Det rensede DNA fra BmNPV T3 blev fordøjet med EcoRI. Fragmenterne blev underkastet elektroforese på 0,7% agarosegel og overført til et nitrocellulose-filter efterfulgt af hybridisering med den ovennævnte probe. Et specifikt hybridiseret DNA-fragment på ca.

- 10,6 kb blev indsat i pBR322 ved dets EcoRI-kløvningssted. Det virale DNA blev således fordøjet med EcoRI efterfulgt af samme phenol-behandling og chloroform-behandling som beskrevet ovenfor i afsnit B-1. Det vandige lag blev fraskilt, der blev tilsat 1/20 volumen 4M natriumchlorid og 2 volumen kold ethanol, og det udfældede DNA blev opløst i en lille mængde Tris-puffer [10mM Tris-hydrochlorid (pH 7,6)-1mM EDTA]. Separat blev pBR322 fordøjet med EcoRI, derefter behandlet på samme måde som ovenfor, yderligere behandlet med BAP[bakteriel alkalisk phosphatase (Bethesda Research Laboratories)], igen underkastet phenolbehandling og chloroform-behandling som ovenfor beskrevet og fældet ved tilsætning af ethanol. Bundfaldet blev opløst i en lille mængde Tris-puffer.

- Disse EcoRI-fordøjelsesprodukter fra det virale DNA og pBR322 blev underkastet ligering ved 5°C i 10 timer med T4-ligase tilsat. Ligeringsproduktet blev indført i kommercielt tilgængelig *Escherichia coli* K12 JM83, og de resulterende tetracyclin-resistente transformanter blev screenet ved koloni-hybridisering under anvendelse af det ovennævnte mærkede cDNA som probe. Herved vandtes en *Escherichia coli*-stamme bærende et plasmid indeholdende et EcoRI-fragment på ca. 10,6 kb med polyhedrin-genet indeholdt deri. Denne stamme blev dyrket, og plasmid-DNA'et blev rensat ved caesiumchlorid-metoden og betegnet pBmE36. En stamme indeholdende plasmidet pBmE36 blev betegnet *Escherichia coli* K12 JM83 DGB-0036 og deponeret i Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, som FERM BP-813. Restriktionsenzymkortet for EcoRI-EcoRI insertionsdelen af pBmE36 er vist i Fig. 2. Den indsatte DNA-del blev undersøgt yderligere ved Southern hybridiseringsmetoden under anvendelse af det ovennævnte mærkede cDNA som probe. cDNA'et hybridiserede kun med et HpaI-HindIII-fragment (ca. 1,8 kb).

C. Eliminering af strukturel polyhedrin-gen-del.
Konstruktion af p9B-række-plasmider.

C-1. Kloning af polyhedrin-gen-holdig del og del nedstrøms fra denne.

5 Et HindIII-HindIII fragment (ca. 3,9 kb) indeholdende det ovennævnte HpaI-HindIII fragment, og et HindIII-HindIII-fragment (ca. 3,1 kb) indeholdende en del nedstrøms fra polyhedrin-genet blev indsat i kommercielle klonings-vektorer henholdsvis pUC9 og
10 pUC8 ved HindIII-stedet deraf for at fremstille henholdsvis p9H18 og p8H225.

C-2. Eliminering af polyhedrin-gen-del.

Plasmidet p9H18 blev kløvet med EcoRI og derefter behandlet med Bal31 for at afskære en del af hver
15 side af kløvningsstedet. Ved at variere tiden for Bal31-behandling blev der fremstillet fragmenter af forskellig længde. Disse blev behandlet med HindIII og separeret ved 0,7% agarosegel-elektroforese efterfulgt af ekstraktion, der gav forskellige virus-afledte DNA-
20 fragmenter af forskellig længde.

pUC9 blev behandlet med SmaI (fremstillet af Takara Shuzo Co., Ltd.) og HindIII efterfulgt af ligering med de ovenfor vundne DNA-fragmenter (med en stump ende og en HindIII-ende). *Escherichia coli* K12 JM83 blev
25 transformeret med de fremstillede plasmider og derefter dyrket, plasmiderne blev udvundet, og base-sekvensen fra 3'-siden af hvert indsat virus-afledt DNA-fragment blev bestemt ved dideoxy-metoden (F.Sanger, Science, 214, 1205-1210, (1981)) under anvendelse af
30 en primer (15-base sekvensbestemmelses-primer af M13) for herved at identificere den virale polyhedrin-gen-del. Således fandtes en base-sekvens svarende til aminosyre-sekvensen af polyhedralt protein, som beskrevet i Serebryani et al., supra, blandt base-sekvenserne af
35 de virus-afledte DNA-fragmenter, og den translationelle start-codon ATG blev også identificeret. Blandt de forskellige plasmider, der vandtes alt efter længden af Bal31-behandlingen, blev det, der manglede de 29

basepar opstrøms fra den translationelle start-codon ATG for polyhedrin-genet og manglede det strukturelle gen for polyhedralt protein (inklusive ATG) betegnet p9B241.

- 5 Tilsvarende blev der fremstillet p9B-række-plasmider, det vil sige, at dem, der manglede de 82 basepar, 19 basepar, 18 basepar og 7 basepar opstrøms fra ATG samt ATG og det følgende blev betegnet henholdsvis p9B587, p9B310, p9B276 og p9B585, og det, 10 der manglede de 23 bp nedstrøms fra ATG, blev betegnet p9B312. Base-sekvensen for den omhandlede region er vist i Fig. 4.

D. Konstruktion af plasmider manglende strukturel polyhedrin-gen-del.

- 15 Plasmidet p9B241 blev behandlet med EcoRI og AatII (fremstillet af Toyobo Co., Ltd.). Separat blev p8H225 (konstrueret under C-1 ovenfor) behandlet med EcoRI, AatII og ScaI (fremstillet af New England Biolabs, USA) (et unødvendigt pUC8-afledt fragment blev 20 omdannet til et lille stykke med ScaI). De to reaktionsblandinger blev hver behandlet med phenol og derefter med chloroform og yderligere behandlet med ethanol til fældning. De to udfældede DNA'er blev ligeret sammen, og *Escherichia coli* K12 JM83 blev transformeret med de 25 resulterende plasmider. Plasmider blev ekstraheret fra transformanterne, og et plasmid, hvori både det virus-afledte opstrøms- og nedstrøms-DNA-fragment var korrekt med hensyn til retning, blev udvalgt. Kløvning med forskellige restriktionsenzymmer viste, at dette rekombinant- 30 plasmid havde en ampicillin-resistens-markør og indeholdt en opstrøms-del af det virale DNA, der startede fra det 30. basepar opstrøms fra start-codon'en ATG for polyhedrin-genet og strakte sig til en længde på ca. 3 kb opstrøms fra nævnte 30. basepar (denne del 35 inkluderende promotor-regionen), og en nedstrøms-del på ca. 3,1 kb nedstrøms fra terminations-codon'en for nævnte gen (men manglende ca. 300 basepar nedstrøms fra terminations-codon'en) begge i samme retning som i det

oprindelige virus. Dette plasmid var i stand til at formere i *Escherichia coli*-systemer og blev betegnet p89B241. Tilsvarende blev p89B587, p89B310, p89B276 og p89B585 konstrueret under anvendelse af henholdsvis p9B587, p9B310, p9B276 og p9B585.

E. Insertion af α -IFN-gen - Konstruktion af pIFN-1-B241.

(i) Leukocyt-IFN-genet blev eftersøgt inden for et humant genom λ phag Charon 4A rekombinant-bibliotek [Lawn et al., Cell, 15, 1157-1174 (1978)], og det således vundne DNA indeholdende α -IFN-J-genet blev behandlet med HindIII og EcoRI, og et α -IFN-J-genholdigt fragment blev isoleret ved agarosegel-elektroforese og ligeret med HindIII- og EcoRI-behandlet pUC9. *Escherichia coli* K12 JM83 blev transformeret med det vundne plasmid. Plasmidet blev udvundet fra transformanten og behandlet med MstII (fremstillet af New England Biolabs, USA) og PvuII (fremstillet af Takara Shuzo Co., Ltd.), og et α -IFN-J-genholdigt DNA-fragment blev isoleret, og en SmaI-linker (fremstillet af Takara Shuzo Co., Ltd.) blev forenet med begge ender af fragmentet. Det samlede produkt blev behandlet med SmaI og ligeret med et SmaI-fragment fra plasmidet p89B241 vundet under D ovenfor, hvorved vandtes et rekombinant-plasmid. Efter at det var bekræftet, at IFN-J-genet var blevet indsat i dette plasmid i den korrekte retning, blev *Escherichia coli* K12 JM83 transformeret med dette plasmid og dyrket, hvorved der blev fremstillet en stor mængde plasmid. Dette plasmid blev betegnet pIFN-1-B241. I dette plasmid var en del opstrøms fra polyhedrin-genet (fra ca. -3 kb basepar til -30 basepar) efterfulgt af en 13 bp rest af den ved konstruktionen af plasmidet p89B241 anvendt linker og yderligere af en 32-bp 5'-ikke-translationsel region af det chromosom-afledte α -IFN-J-gen, hvilken region på sin side efterfulgtes af α -IFN-J-genet begyndende med ATG og med den korrekte retning. Endvidere var der en del nedstrøms fra polyhedrin-genet (fra et basepar ca. 300 bp nedstrøms fra terminations-codon'en til et

basepar ca. 3,1 kbp nedstrøms fra dette basepar), der var forbundet til α -IFN-J-genet.

(ii) Insertion af α -IFN-gen - Konstruktion af pIFN-2B-plasmider.

- 5 Escherichia coli K12 JM83 blev transformeret med ovennævnte plasmid, nemlig produktet fra ligering af ovennævnte α -IFN-J-genholdige HindIII-EcoRI-fragment med pUC9. Plasmidet blev udvundet fra transformanten og behandlet med HpaII (fremstillet af Takara Shuzo
- 10 Co., Ltd.), og et α -IFN-J-genholdigt DNA-fragment blev fraskilt og ligeret med produktet fra "annealing" af en kemisk syntetiseret oligomer (CGGGCCATC) phosphoryleret under anvendelse af ^{32}P -ATP og T_4 -polynucleotid-kinase (fremstillet af Takara Shuzo Co., Ltd.), med en anden
- 15 syntetisk oligomer (CCGGGATGGCC). Ligeringsproduktet blev fraskilt ved agarosegel-elektroforese efterfulgt af ekstraktion, derefter igen phosphoryleret under anvendelse af ^{32}P -ATP og T_4 -polynucleotid-kinase og ligeret med et XmaI-fragment (XmaI fremstillet af
- 20 New England Biolabs, USA) af plasmidet p89B241 vundet under D ovenfor, hvorved vandtes et rekombinant-plasmid. Efter bekræftelse af, at α -IFN-J-genet var blevet indsat i dette plasmid i den rigtige retning, blev Escherichia coli K12 JM83 transformeret med plasmidet
- 25 og dyrket, hvorved plasmidet blev fremstillet i stor mængde. Dette plasmid blev betegnet pIFN-2-B-241.

- I dette plasmid var en opstrømsdel (opstrøms fra polyhedron-genet) (fra et basepar ca. 3 kb opstrøms til -30 basepar) efterfulgt af en 13-bp rest af den ved
- 30 konstruktion af plasmidet p89B241 anvendte linker, derefter af α -IFN-J-genet begyndende med ATG og indsat i den korrekte retning, og yderligere af en nedstrøms-del (nedstrøms fra polyhedron-genet) (fra et basepar ca. 3000 bp nedstrøms fra terminations-codon'en
- 35 til et basepar ca. 3,1 bp nedstrøms fra nævnte basepar).

pIFN-2-B587, pIFN-2-B310, pIFN-2-B276 og pIFN-2-B585 blev konstrueret på samme måde under anvendelse

af henholdsvis p89B587, p89B310, p89B276 og p89B585 som udgangsmateriale.

(iii) Syntese af linker.

Kemisk syntese af oligodeoxyribonucleotider:

- 5 Ved metoden beskrevet i H. Ito et al. [Nucleic Acids Research, 10, 1755 (1982)], og som vist skematisk i Fig. 5, blev oligomere syntetiseret ved fastfase-metoden under anvendelse af en polystyrenharpiks. Herved blev en fuldstændigt beskyttet difunktionel dimer
- 10 (I) (ca. 100 mg) omdannet til den tilsvarende 3'-phosphodiester (II) ved behandling i en tert-butylamin-pyridin-opløsning (1:9 vol./vol.), og 3'-phosphodiesteren (II) blev kondenseret med en 5'-fri nucleosid-harpiks (III) under anvendelse af kondensationsmidlet mesitylen-
- 15 sulfonylnitrotriazolid (MSNT, 100 mg). 5'-Hydroxy-gruppen af den ubehandlede harpiks (III) blev acetyleret under anvendelse af eddikesyreanhydrid-pyridin-opløsning (1:9 vol./vol.). Den efterfølgende behandling i 2% trichloreddikesyre (TCA)-methylenchlorid gav et
- 20 detrityleringsprodukt (IV). Den ovennævnte reaktionsfølge blev gentaget, indtil der var opnået en specifik ønsket sekvens. Til den således vundne oligomer-bundne harpiks (ca. 20 mg) blev der sat 0,5 ml 0,5M tetra-
- 25 methylguanidin-pyridin-2-aldoxim [i pyridin-vand (15:4 efter volumen)]. Efter 8 timers reaktion ved 37°C blev reaktionsblandingen behandlet med koncentreret vandig ammoniak ved 55°C i 8 timer. Gel-filtrering af opløsningen under anvendelse af en fin søjle (2,5 x 60 cm) af Sephadex G-50 (en celluloseharpiks frem-
- 30 stillet af Pharmacia) gav en DMTr-oligomer. Denne oligomer blev rensset yderligere ved HPLC under anvendelse af en omvendt-fase-søjle (SSC-ODS-272, 0,6 x 20 cm) og opløsninger A (0,02M triethylammonium-acetat, pH 7,0) og B (50% acetonitril i 0,02M TEAA, pH
- 35 7,0) til dannelsen af en lineær koncentrationsgradient. Den således rensede DMTr-oligomer blev behandlet med 80% eddikesyre ved stuetemperatur i 20 minutter for at opnå detritylering, efterfulgt af samme HPLC som ovenfor.

Dialyse af eluatet mod 10mM Tris-HCl (pH 7,5)-1mM EDTA (pH 8,0) gav en ønsket oligomer. Homogeniteten af det således vundne fuldstændigt afbeskyttede oligodeoxyribonucleotid blev konstateret ved, at om-

5 vendt-fase-søjlechromatografi kun gav én enkelt spids, og ved, at 15% polyacrylamidgel-7 M urinstof-elektroforese efter mærkning af 5'-enden under anvendelse af [γ - 32 P]-ATP og T_4 polynucleotid-kinase kun gav ét enkelt bånd.

10 (iv) Insertion af α -IFN-gen - Konstruktion af pBM 034.

Plasmidet pBM 030 blev fremstillet ud fra plasmid p9B 312, som vist i Fig. 6. Dette plasmid har den promotor-region og terminator-region, der oprindeligt

15 forekommer i BmNPV, bortset fra tre basepar (3 bp) og har en polylinker mellem disse regioner i stedet for det polyhedrale gen, som vist i Fig. 7. I Fig. 6 er fremgangsmåden til fremstilling af p9M312 ud fra p9B312 kendt som in vitro-mutagenese (oligonucleotid-

20 rettet mutagenese, Nucleic Acids Research 9 (15) 3647-3656 (1981)), der også blev anvendt i en anden del.

Til vektoren (pBM030) blev der indsat α -IFN-gen ved fremgangsmåden vist i Fig. 9, til dannelse af

25 pBM034.

F. Transfektion af Bm celler - Fremstilling af rekombinant BmNPV.

Det virale BmNPV-T3-stamme-DNA (ARCC nr. 40188) og pIFN-1-B241, i forholdet 1:100, blev blandet med

30 opløsningerne I og II med følgende respektive sammensætning:

26

I. Destilleret vand	2,1 ml
Bærer-DNA (lakse-testikel, 1 mg/ml)	50 µl
BmNPV-DNA	10 µl
pIFN-1-B241-DNA	50 µg
5 2M Calciumchlorid	300 µg
II. 50mM HEPES-puffer (pH 7,1) inde-	
holdende 0,28M natriumchlorid	2,5 ml
Phosphat-puffer (35mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$	
35mM NaH_2PO_4)	50 µl

10

En 1 ml's portion af den resulterende suspension blev sat til 4 ml af et Bm-celle-dyrkningsmedium for herved at indføre det ovennævnte DNA i celler af Bombyx mori. Tyve timer senere blev mediet erstattet med en frisk portion medium. Efter yderligere dyrkning i 5 dage blev mediet indvundet og centrifugeret. Den klare supernatant blev underkastet α -IFN-aktivitetsprøve. Yderligere blev den fra mediet vundne supernatant, der blev udvundet ved centrifugering ved 1.000 rpm i 5 minutter, fortyndet og underkastet plaque-prøve. Fire dage senere blev plaque'er undersøgt under et mikroskop, og polyhedron-frie plaque'er udvalgte. Tre repetitioner af denne proces gav en enkelt viral stamme, der er en rekombinant BmNPV. Bm-celler blev inficeret med denne virale stamme, og efter 5 dages dyrkning blev mediet indvundet.

G. Ekspression af α -IFN i Bombyx mori.

Silkeorme på dag 1 af 5. stadium blev injiceret percutant med mediet indvundet efter 5 dages dyrkning, som beskrevet under F, eller med det efter 5 dages dyrkning efter infektion med den enkelte virale stamme i en dosis på 0,5 ml/hoved (10^7 pfu) indvundne medium og derefter fodret med morbærblade ved 25°C i 5 dage. Derefter blev en indsamlingsnål stukket ind i det abdominale vedhæng, og legemsvæsken blev indsamlet i et isafkølet Eppendorff-rør. Legemsvæsken, med samme volumen TC-10 medium tilsat, blev centrifugeret (10.000 rpm, 5 minutter), og supernatanten blev prøvet

for α -IFN-aktivitet.

H. Bioprøve af α -IFN.

(i) Aktivitetssmåling.

Ved fremgangsmåden ifølge C.Philip et al.

- 5 [Methods in Enzymology, 78, 387-394 (1981)] udførtes α -IFN-aktivitetssprøven på måden for cytopatisk virknings-hæmningsprøve (50% CPE-hæmning) på en 96 rums mikro-titerplade under anvendelse af humane amnion-afløede FL-celler og vesiculær stomatitis-virus (VSV), idet der
10 blev sammenlignet med en α -IFN-standard fra the U.S.-National Institute of Health (NIH). De opnåede resultater er vist i nedenstående Tabel I og Tabel II (for hver enkelt viral stamme).

15

Tabel I

	<u>Plasmid</u>	<u>IE/ml</u>
I Bm-celle-dyrknings- væske	pIFN-1-B-241	$1,2 \times 10^4$
	pIFN-2-B 241	$1,3 \times 10^4$
	pIFN-2-B 587	24
20	pIFN-2-B 310	$1,5 \times 10^4$
	pIFN-2-B 276	$1,4 \times 10^4$
	pIFN-2-B 585	$4,8 \times 10^4$
I silkeorm-legems- væske	pIFN-1-B 241	$3,0 \times 10^4$

25

Tabel II

	<u>Plasmid</u>	<u>IE/ml</u>
I silkeorm-legems- væske	pIFN-2-B-241	$6,6 \times 10^6$
	pIFN-2-B 587	$3,5 \times 10^2$
	pIFN-2-B 310	$4,4 \times 10^7$
30	pIFN-2-B 276	$3,6 \times 10^7$
	pIFN-2-B 585	$4,2 \times 10^7$
	pBM034	$1,0 \times 10^8$

35

(ii) Bestemmelse af N-terminal af α -IFN.

Efter rensning med en antistof-søjle blev N-terminalen af α -IFN, der var fremstillet i silkeorm under anvendelse af pB034, bestemt. De elleve terminale
5 aminosyrer svarede til dem fra α -IFN-standarden.

Dette betyder, at silkeorm-cellen opfatter signal-sekvensen af det humane protein korrekt, og der udføres i cellen ekspression med nøjagtig oparbejdning.

J. Fremstilling af rekombinant BmNPV indeholdende β -IFN-gen og ekspression deraf in vitro og in vivo.
10

Det rekombinante phag charon 4A-bibliotek for det humane genom blev screenet for β -IFN-gen. Det således vundne DNA indeholdende β -IFN-genet blev kløvet med HindII, og β -IFN-genholdigt fragment blev isoleret
15 ved agarosegel-elektroforese. Dette fragment blev ligeret til HindII-stedet af pUC9. Det resulterende plasmid blev behandlet med HindII og BglII. Det β -IFN-genholdige fragment blev isoleret ved metoden beskrevet under E ovenfor og ligeret med EcoRV-behandlet
20 pBM010. Dette plasmid blev betegnet pBM211. Rekombinant virus blev isoleret ved samme metode som beskrevet under F ovenfor.

Under anvendelse af således vundet rekombinant BmNPV blev der udført ekspression i silkeorm ved
25 samme metode som beskrevet under G ovenfor.

Når β -IFN-aktivitet blev bestemt under anvendelse af β -IFN-standardprøve ved metoden ifølge H, viste det sig, at det rekombinante BmNPV producerede ca. 8×10^5 E/ml og 8×10^4 E/ml af β -IFN i henholdsvis haemolymfe
30 og Bm-celle.

Det af det rekombinante virus producerede IFN blev neutraliseret med et monoklonalt antistof over for humant β -IFN.

Opfindelsen er ovenfor beskrevet detaljeret og med henvisning til specifikke udførelsesformer.
35

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider, k e n d e t e g n e t ved, at der i dyrkede celler eller i en anden egnet værtsorganisme
5 opformeres et rekombinant Bombyx mori nucleart polyhedrosis-virus(BmNPV)-DNA, der er fremstillet ved rekombination med et dobbeltstrenget DNA indeholdende (i) et 5'-opstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle gen, der
10 koder for polyhedralt protein, og også inkluderende promotor-regionen for nævnte strukturelle gen, (ii) en translationel start-codon og (iii) et gen, der koder for et nyttigt polypeptid exogent for nævnte virus, med eller uden (iv) et 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-fragment
15 oprindeligt forekommende nedstrøms fra nævnte strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af nyttige polypeptider, k e n d e t e g n e t ved, at det rekombinante BmNPV-DNA opformeres i en etableret
20 cellelinie fra Bombyx mori eller i levende silkeorme.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter

- udskæring fra Bombyx mori nucleart polyhedrosis-
25 virus(BmNPV)-DNA af (a) det strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein, sammen med en 5'-opstrøms-del opstrøms fra nævnte strukturelle gen og også inkluderende promotor-regionen for nævnte strukturelle gen og (b) en 3'-nedstrøms-del nedstrøms fra nævnte strukturelle gen,
30 turelle gen,

- indføring af (c) et gen, der koder for et nyttigt stof exogent for nævnte virus, i stedet for den strukturelle gen-del af det vundne DNA-fragment,

- insertion af substitutionsproduktet i en vektor,
35 - indføring af det således fremstillede rekombi-

nante DNA for overføring kombineret med BmNPV-DNA'et i celler eller en vært til transfektion, og

- opformering af det resulterende rekombinante BmNPV-DNA.

- 5 4. Fremgangsmåde til fremstilling af nyttige polypeptider ved genteknik, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes (a) en 5'-opstrøms BmNPV-DNA-del oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein, og også inklu-
10 derende promotor-regionen for nævnte strukturelle gen og (b) en 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-del oprindeligt forekommende nedstrøms fra nævnte strukturelle gen.

5. Rekombinant BmNPV-DNA, k e n d e t e g n e t ved, at det er fremstillet ved rekombination med et
15 dobbeltstrenget DNA indeholdende (i) et 5'-opstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein, og også inkluderende promotorregionen for nævnte strukturelle gen, (ii) en translationel start-
20 codon og (iii) et gen, der koder for et nyttigt polypeptid exogent for nævnte virus, med eller uden et 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt forekommende nedstrøms fra nævnte strukturelle gen, der koder for polyhedralt protein.

- 25 6. Rekombinant BmNPV-DNA ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det er fremstillet ved rekombination under anvendelse af et gen, der koder for et nyttigt polypeptid exogent for nævnte BmNPV-DNA, som et heterologt gen.

- 30 7. Rekombinant BmNPV-DNA ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at rekombinationen omfatter substitution af nævnte heterologe gen i genregionen for polyhedralt protein i nævnte BmNPV-DNA eller insertion i en anden region af nævnte BmNPV-DNA.

8. Vektor, der er anvendelig ved fremgangsmåden
ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at
den indeholder (i) et 5'-opstrøms BmNPV-DNA-fragment
oprindeligt forekommende opstrøms fra det strukturelle
5 gen, der koder for polyhedralt protein, og stadig
inkluderende promotor-regionen for nævnte strukturelle
gen, (ii) (a) en translationel start-codon og (b) et
gen for et nyttigt peptid exogent for nævnte virus, og
(iii) et 3'-nedstrøms BmNPV-DNA-fragment oprindeligt
10 forekommende nedstrøms fra nævnte strukturelle gen.

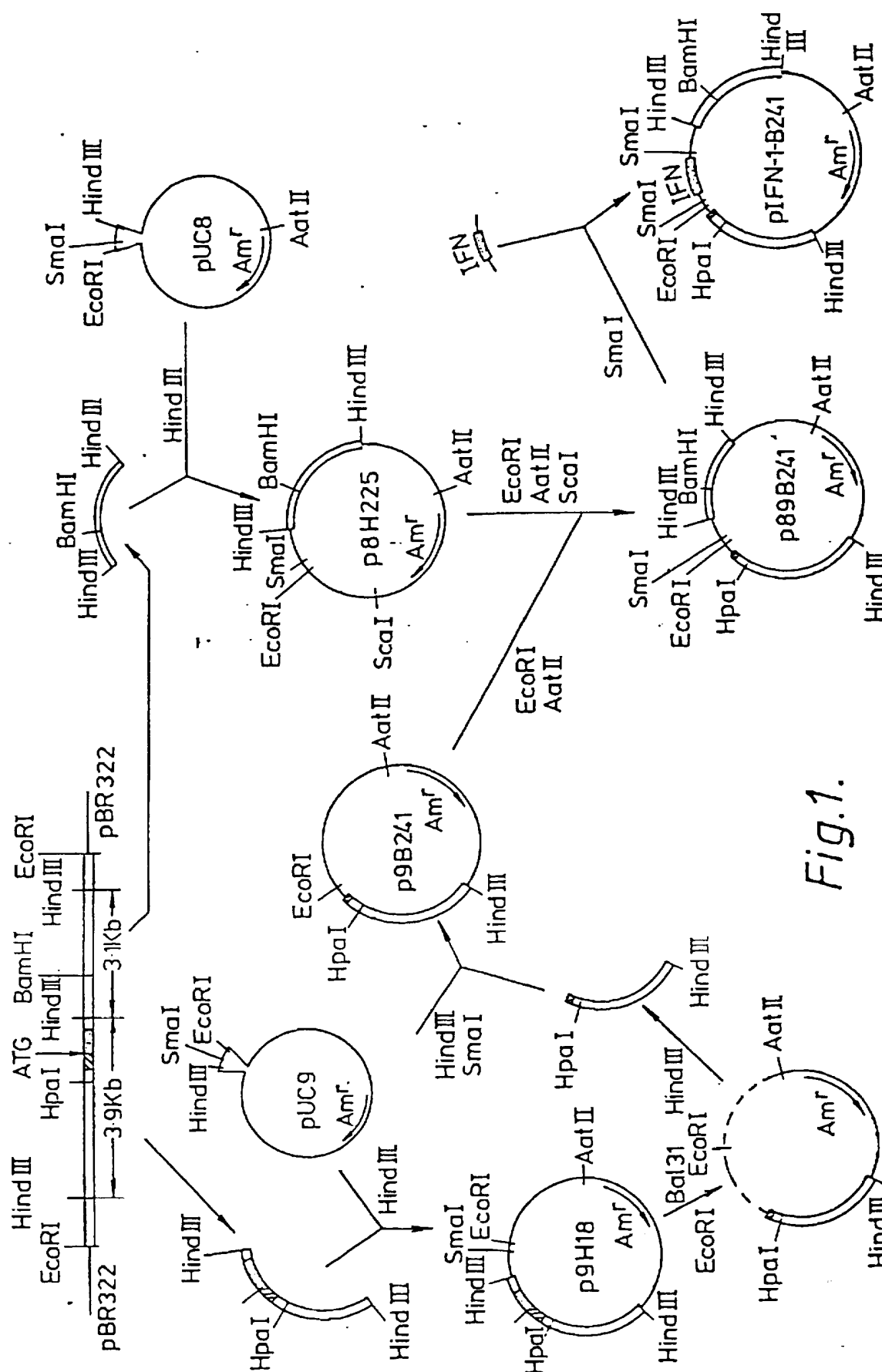


Fig.1.

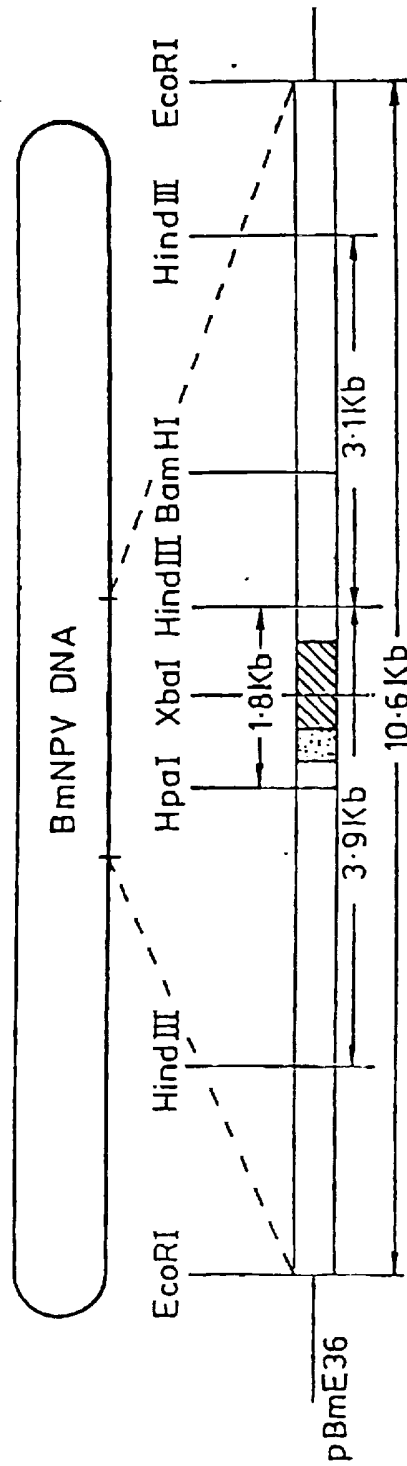
*Fig.2.*

Fig. 3A.

- 382

^{5'}
 CAGGAAGAGGTTTATACTAAAC
 TGTACATTGCAAAACGTGGTTTTCGTGTACCAAATGTGAAA
 ACCGATGTTTGATCAAGGCTCTGACACATTTTTTACAATTA
 CGACTCCAAGTGTTGTGGGTGAAGTCATGCATCTTTTAATC
 AAATCCCAAGATGTGTATAAAACCAACCAAACTGCCAAAAAA
 TGAAAACCTGTCGACAAGCTCTGTCCGTTTGCTGGCAACTG
 CAAGGGCCTCAATCCTATTTGTAAATTATTGAACAATAAA
 CAATTATAAATGTCAAATTTGTTTTTTATTAAACGATACAA
 ATGGAAATAATAAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTA
 CTGTTTTTCGTAAACAGTTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAAT
 1 2 3
ATGCCGGAATTATTCATACACCCCCACCATCGGGCGTACTT
 ACGTGTAACGACAATAAATATTACAAAACTTGGGCTGTCT
 TATCAAAAACGCCAAGCGCAAGAAGCACCTAGTCGAACAT
 GAACAAGAGGAGAAGCAATGGGATCTTCTAGACAACCTACA
 TGGTTGCGCAAGATCCCTTTTTTAGGACCGGGCAAAAAACCA
 AAAAATTACCCCTTTTTTAAAGAAATTTCGCACTGTGAAACCC
 GATACCATGAAGTTAATCGTCAACTGGAGCGGCAAAAGAGT
 TTTTGCGTGAAACTTGGACCCCGTTTTGTTGAGGACAGCTT
 CCCCATTTGTAAACGACCAAGAGGTGATGGACGTGTACCTC
 GTCGCCAACCTCAAAACCCACACGCCCCCAACAGGTGCTACA
 AGTTCCTCGCTCAACACGCTCTTAGGTGGGAAGAAAGACTA
 CGTGCCCCACGAAGTAATCAGAATTATGGAGCCATCCTAC
 GTGGGCATGAACAACGAATACAGAATTAGTCTGGCTAAAA
 AGGGCGGGCGGCTGCCCAATCATGAACATCCACAGCGAGTA

Fig. 3B.

CACCAACTCGTTTCGAGTCGTTTGTGAACCGCGTCATATGG
GAGAACTTCTACAAACCCATCGTTTACATCGGCACAGACT
CTGCCGAAGAAGAGGAAATCCTAATTGAGGTTTCTCTCGT
TTTCAAAATAAAGGAGTTTGCACCAGACGCGCCTCTGTTT
ACTGGTCCGGCGTATTAAAACACTATACATTGTTATTAGT
ACATTTATTAAAGCGTTAGATTCTGTGCGTTGTTGATTTAC
AGACAATTGTTGTACGTATTTTAATAAATTCATTAAATTTG
TAATCTTTAGCGTGGTATGTTAGACCGAAAATCAAATGAT
TTTCACGTAGTCTTTGTATCTGAATTTAAATATTAAATCC
TCAATAGATTTGTAAAAATAGGTTTTCGATTGGTTTCAAACA
AGGGTTGTTTTTTGCAAACCGATGGCTGGACTATCTAATGG
ATTTTTCGCTCAACACCACACGACTTGCCAAATCTTGTAGC
AGCAATCTAGCTTTGTGCGATATTCGTTTGTGTTTTGTTTT
GTAATAAAGATTTCGACGTCGTTCAAAATATTATGCGCTTT
TGTAATTTTTTTTCATCACTGTCGTTGGTGTACAATTGACTC
GACGTAAACACGTTAAATAAAGCTT 3'

Fig.4.

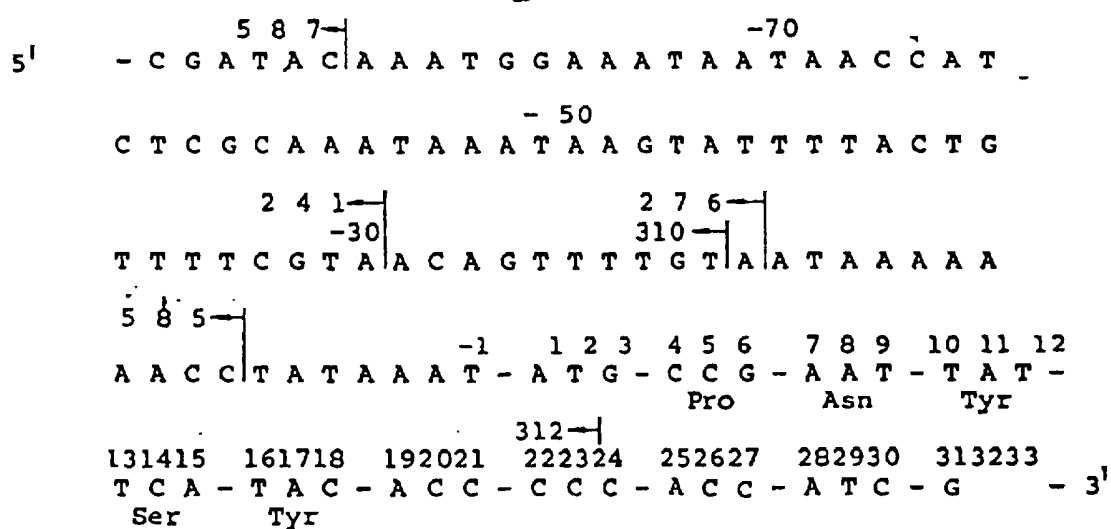


Fig.5.

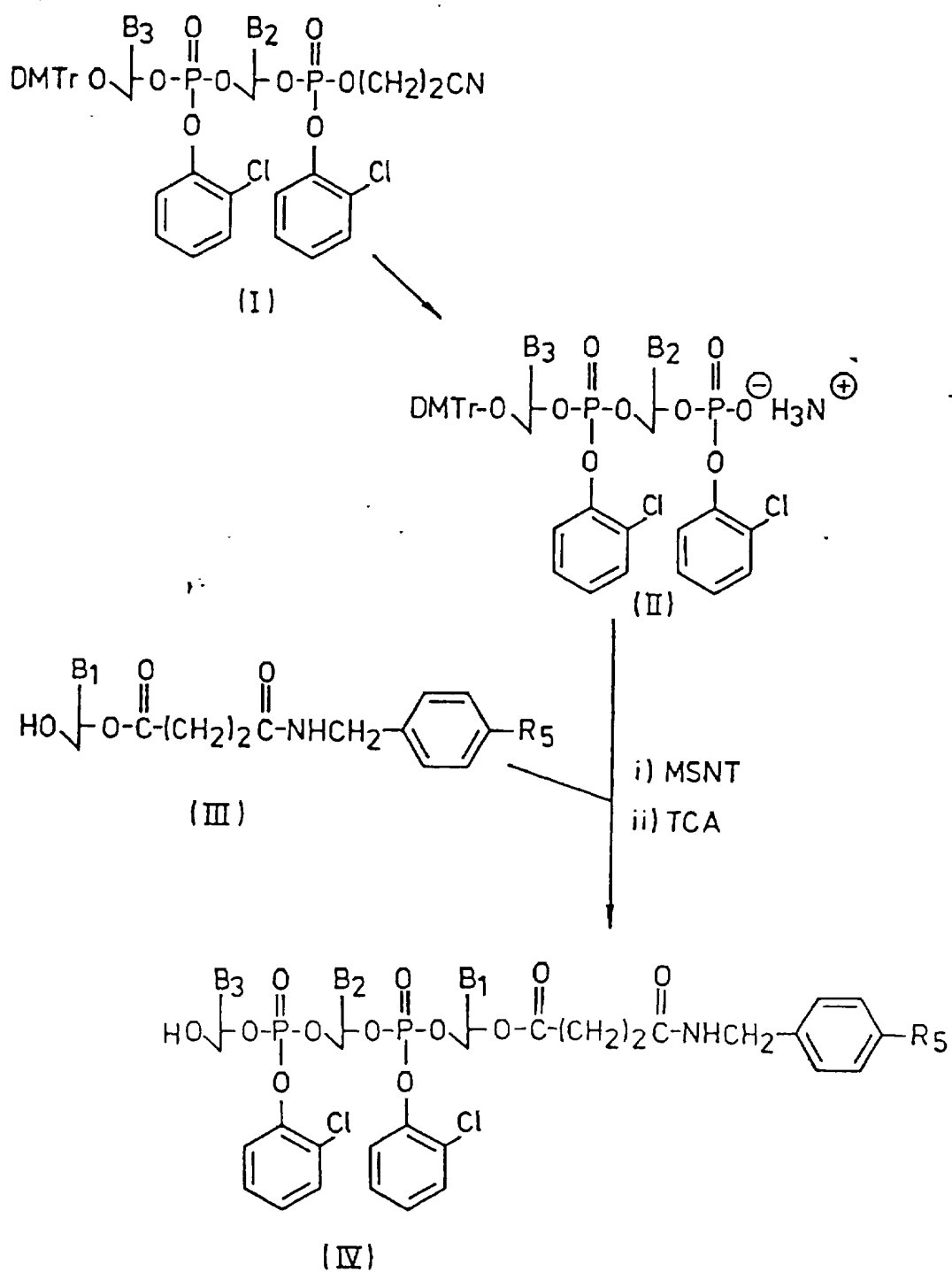
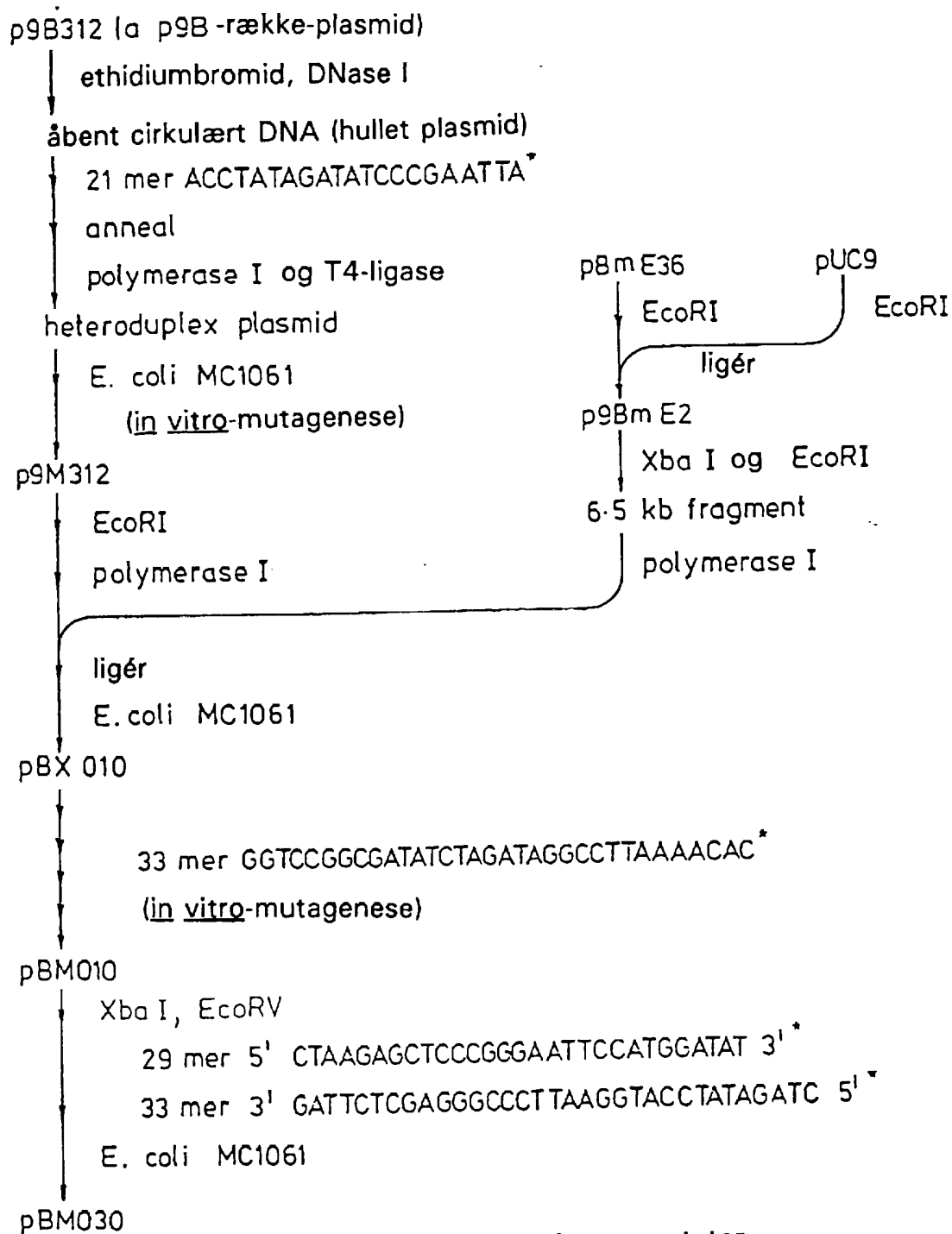


Fig.6.



• syntetiseret mutator

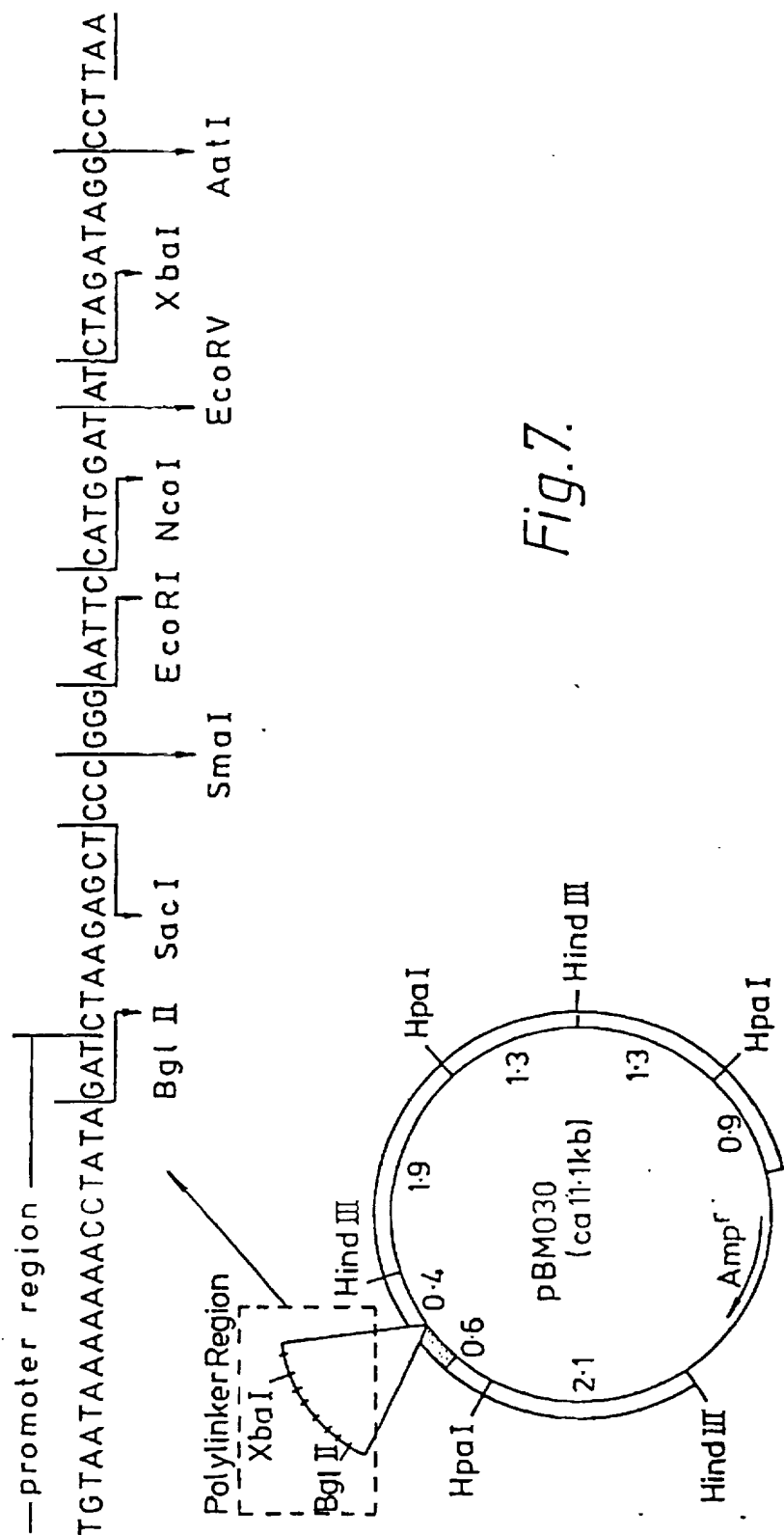


Fig.7.

Fig. 8.

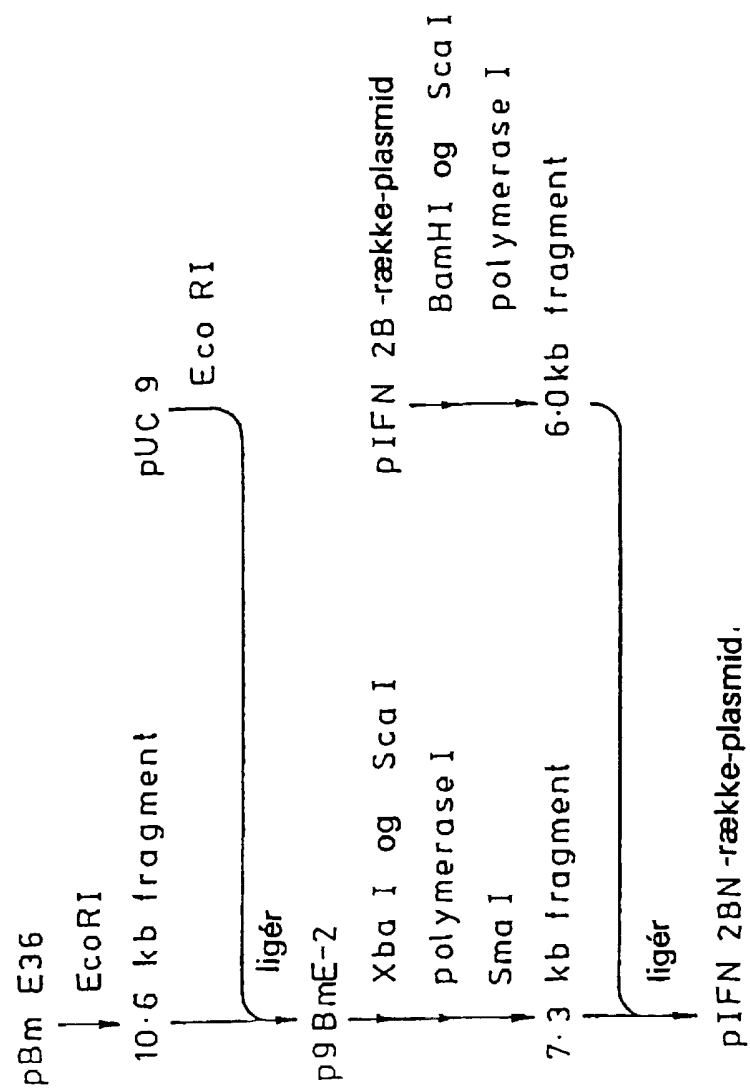


Fig. 9.

