



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

- (51) Int.Cl.: C 12 N 15/33      C 12 N 15/64
- (21) Patentansøgning nr: PA 1988 04785
- (22) Indleveringsdag: 1988-08-26
- (24) Løbedag: 1988-08-26
- (41) Alm. tilgængelig: 1989-11-07
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-10-18
- (30) Prioritet: 1988-05-06 GB 8810808
- 
- (73) Patenthaver: The Wellcome Foundation Limited, 183-193, Euston Road, London NW1 2BP, Storbritannien
- (72) Opfinder: Martin John Page, c/o The Wellcome Foundation Limited, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, Storbritannien  
Brian Colin Rodgers, c/o The Wellcome Foundation Limited, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, Storbritannien
- 
- (74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau A/S, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark
- 

(54) Benævnelse: **Baculovirus overføringsvektor samt fremgangsmåde til fremstilling af en rekombinant baculovirus inkorporerende et fremmed gen**

(57) Sammendrag:

Baculovirus overføringsvektor, der indeholder et gen-  
nemsæringssted, hvori et fremmed gen kan klones, en  
kort afstand efter N-terminus for polyhedringenområdet  
og hvor det naturligt forekommende ATG translations-  
startkodon for polyhedringenet ikke forefindes, således  
at den N-terminale polyhedrinkodende sekvens før gen-  
nemsæringsstedet bevares, men ikke kan translateres.

Opfindelsen angår baculovirus overføringsvektorer og anvendelse deraf.

Man har benyttet baculovirus vektorsystemet til at eksprimere både prokaryotiske og eukaryotiske gener. 5 Ekspressionen af disse gener kontrolleres af polyhedrinpromotoren fra en baculovirus, især fra Autographa californica nukleær polyhedrosisvirus (AcNPV). De fremmede gener eksprimeres i dyrkede insektceller, der inficeres med rekombinant baculovirus, der indeholder det 10 fremmede gen.

Til opnåelse af en rekombinant baculovirus benytter man en baculovirus overføringsvektor. Denne vektor inkluderer polyhedrinpromotoren. Der tilvejebringes baculovirus DNA, der flankerer polyhedringenet. Resten 15 af vektoren består typisk af DNA fra et bakterieplasmid. Man indsætter et fremmed gen i overføringsvektoren efter polyhedrinpromotoren på en måde, så eksprimeringen deraf kontrolleres af denne promotor.

Overføringsvektoren, der indeholder det fremmede 20 gen, og en baculovirus cotransficerer derefter insektceller, der er modtagelige for baculovirusinfektion. Man benytter typisk cellekulturer af Spodoptera frugiperda. Der forekommer derved en homolog rekombination, der involverer viral DNA i overføringsvektoren både før 25 og efter det fremmede gen, og det tilsvarende DNA fra baculovirus. Det fremmede gen og dets polyhedrinpromotor overføres på denne måde til baculovirus. Man dyrker det rekombinante baculovirus til opnåelse af eksprimering af det fremmede gen.

30 Der findes to typer baculovirus overføringsvektorer. Først eksisterer der overføringsvektorer, der indeholder et gennemskæringssted, hvori man kan klonere et fremmed gen efter polyhedrin ATG startkodonet for translation. Sådanne overføringsvektorer fører til fusionsproteiner, hvori produktet af det fremmede gen er 35 fusioneret med en N-terminal del af polyhedrinpeptidet.

For det andet findes der overføringsvektorer, hvori den 5'-ikke translaterede leader fra polyhedrin-genet ender før det naturligt forekommende ATG translationskodon for polyhedrin, og der derefter forekommer 5 et gennemskæringssted. En sådan overføringsvektor er pAc373, hvori den 5'-ikke translaterede leader ender 8 baser før det naturligt forekommende polyhedrin ATG. Gener klonede i gennemskæringsstedet eksprimeres som færdige proteiner, hvis de indeholder et ATG fulgt af 10 en åben læseramme, der koder for det ønskede produkt.

Ifølge opfindelsen tilvejebringes en baculovirus overføringsvektor, der indeholder et gennemskæringssted i hvilket et fremmed gen kan klones, kort efter N-terminus for polyhydringenområdet, og hvori det naturligt 15 forekommende ATG translationsstartkodon for polyhedrin-genet ikke forefindes, idet den N-terminale polyhedrin-kodende sekvens før gennemskæringsstedet bevares, men ikke kan translateres.

I baculovirus overføringsvektoren ifølge opfindelsen 20 delsen tilvejebringes således en ikke kodende sekvens i stedet for det naturligt forekommende ATG translationskodon for polyhedrin. Den N-terminale del af den kodende sekvens for polyhedrin translateres ikke nu, men virker som en forlænget leadersekvens. Der tilvejebringes 25 derfor en nyttig alternativ baculovirus overføringsvektor, der opretholder DNA sekvensinformation, der kan være nyttig til eksprimering af færdige proteiner, og som hører til den N-terminale del af den kodende sekvens for polyhedrin. Man har fundet, at et fremmed 30 med gen forsynet med et ATG translationsstartkodon kan eksprimeres med højt udbytte, når det klones i gennemskæringsstedet på overføringsvektoren. Det er en fordel, at det eksprimerede produkt ikke er på form af et fusionsprotein, der indeholder rester af N-terminale 35 polyhedrinamino-syrer.

Der tilvejebringes et gennemskæringssted i baculovirus overføringsvektoren efter og i kort afstand fra

N-terminus af polyhedrinområdet. Gennemskæringsstedet kan tilvejebringes efter de første 24-50 baser, f.eks. efter de første 27-39 baser af den N-terminale region i polyhedringenet. Især tilvejebringes stedet efter ca. 5 de første 33 baser. Man kan f.eks. indsætte en BamHI linker.

Det naturligt forekommende ATG polyhedrin translationsstartkodon ændres til ikke kodende information. Man kan ændre startkodonet til en hvilken som helst anden triplet af nukleotider. Man foretager foretrukket en enkelt baseændring i det naturligt forekommende ATG kodon, mere foretrukket i den tredje base i kodonet. Man kan således ændre ATG til ATA, ATT eller især til ATC. Som et resultat deraf vil den N-terminale del af 15 polyhedringenet ikke blive eksprimeret, men i stedet for vil ekspressionen begynde ved det første ATG, man møder i en sekvens, der er indført ved gennemskæringsstedet. På denne måde kan DNA-sekvensinformation, der findes i den N-terminale del af polyhedringenet i sig selv bidrage til en høj ekspression af et fremmed gen. 20

En foretrukket overføringsvektor er pAc36C. Denne blev konstrueret fra overføringsvektoren pAc360 (Summers og Smith, 1987, "A Manual of methods for Baculovirus vectors and Insect cell culture procedure") ved 25 positionsrettet mutagenese, hvori ATG translationskodonet for polyhedrin i pAc360 blev omdannet til ATC.

#### pAc360

30 TATAAAT ATG CCG GAT TAT TCA TAC CGT CCC ACC ATC GGG (Bam HI)

translateret N-terminal del af polyhedringen

#### pAc36C

35 TATAAAT ATC CCG GAT TAT TCA TAC CGT CCC ACC ATC GGG (Bam HI).

Man kan konstruere en baculovirus overføringsvektor ifølge opfindelsen ved at mutere det naturligt

forekommende ATG translationsstartkodon for polyhedrin i en baculovirus overføringsvektor hvori der tilvejebringes et gennemskæringssted, i hvilket et fremmed gen kan klones, kort efter N-terminus i polyhedringenområdet, til en ikke-kodende sekvens. Dette opnås typisk ved positionsrettet mutagenese. Man kan indføre en mutation, især en punktmutation under anvendelse af et syntetisk oligonukleotid, der omfatter den ønskede sekvens. Man afleder en rekombinant baculovirus, der indeholder et fremmed gen, fra overføringsvektoren, idet man:

- (a) kloner et fremmed gen forsynet med et translationsstartkodon i baculovirus overføringsvektoren ved det tilvejebragte gennemskæringssted; og
- (b) co-transficerer insektceller, der er modtagelige for baculovirusinfektion, med den rekombinante baculovirus overføringsvektor fra trin (a) og med intakt vild-type baculovirus DNA.

Det fremmede gen klones i trin (a) i baculovirus overføringsvektoren, så det er under transkriptionskontrol af polyhedrinpromotoren. Man co-transficerer typisk celler af Spodoptera frugiperda insektcellelinien i trin (b). Efter homolog rekombination overføres det fremmede gen og flankerende dele af viral DNA til baculovirus AcNPV. Man gennemsøger rekombinant baculovirus, f.eks. ved plakassay, og renser det.

Til opnåelse af det produkt, det fremmede gen koder for, inficerer man celler, der er modtagelige for baculovirusinfektion, med den rekombinante baculovirus og dyrker dem. Igen anvender man her typisk celler af Spodoptera frugiperda insektcellelinien. Da det fremmede gen er under transkriptionskontrol af polyhedrinpromotoren, kan man opnå et stort udbytte af genproduktet.

Et hvilket som helst fremmed gen, prokaryotisk eller eukaryotisk, kan eksprimeres på denne måde. F.eks. kan man eksprimere en intracellulær færdig form

for human  $\gamma$ -interferon eller cytomegalovirus umiddelbart tidlig protein. Man har også med held eksprimeret kimæreproteiner, der i det væsentlige består af:

(i) ved N-terminus for kimæreproteinet, en signalsekvens for precursoren til de vigtigste merozoit overfladeantigener (PMMSA) fra P. falciparum;

(ii) eventuelt i det mindste én epitop fra circumsporozoitproteinet (CSP) fra P. falciparum; og

(iii) et C-terminalt fragment fra PMMSA fra P. falciparum med eller uden den C-terminale ankersekvens.

Der kan tilvejebringes korte sammenbindende sekvenser på op til 30 aminosyrerester mellem disse komponenter. Disse kimæreproteiner, der er nyttige som vacciner, blev eksprimeret med den korrekte information. CSP epitop(erne) (ii) bestod foretrukket af 3-50, f.eks. 16-30 gentagelser af tetrapeptidsekvensen Asn-Ala-Asn-Pro.

De følgende eksempler illustrerer opfindelsen.

På tegningen visr:

figur 1 PMMSA og CSP generne dele deraf benyttet i eksemplerne og syntetiske linkere anvendt i eksemplerne, idet følgende gennemskæringssteder er opmærket: A-AluI, B-BamHI, H-HindIII, P-PstI, T-TthIII og X-XhoII, A betegner ankersekvensen og S betegner signalsekvensen;

Figur 2 strukturelle gener, der benyttes til opnåelse af rekombinante overføringsvektorer og rekombinant baculovirus fra eksemplerne 2 og 3;

Figur 3 autoradiogrammer frembragt ved  $^{35}\text{S}$ -methioninmærkning i eksempel 5;

Figur 4 resultatet af Coomassie blåfarvning i eksempel 5; og

Figur 5 resultatet af Coomassie blåfarvning i eksempel 6.

Eksempel 1Konstruktion af overføringsvektor pAc36C

Man afledte overføringsvektoren pAc36C fra  
5 pAc360 (Summers og Smith, 1987, "A Manual of methods  
for baculovirus vectors and insect cell culture  
procedures") ved positionsrettet mutagenese under an-  
vendelse af udstyr fra Anglian Biotech og Amersham  
International. Man underklonede et 852 bp cDNA for hu-  
10 man  $\gamma$ -interferon som et BamH1 fragment i BamH1 stedet  
på pAc360. Fra dette underklonede man et 1kb DraI frag-  
ment, der strakte sig fra ca. 700 bp før polyhedrin ATG  
translationskodonet til 300 bp inden i 5'-enden af  $\gamma$ -  
interferon cDNA indsætningsstykket, i SmaI stedet på  
15 M13K19 (Anglian Biotech). Man benyttede RF formen af  
konstruktionen til at bekræfte ligeringen og afledte en  
enkeltstrenget skabelon og muterede den med den 19  
mere:

20

GAATAATCCGGGATATTTA.

Det understregede G vil omdanne ATG i polyhe-  
drintranslationskodonet til ATC. Man bekræftede muta-  
tionen ved DNA sekvensopdeling og benyttede et 136 bp  
25 EcoRV-BamH1 fragment, der indeholdt mutationen, til at  
erstatte det samme fragment i pAc360 med det mutageni-  
serede fragment til opnåelse af pAc36C.

Eksempel 230 Konstruktion af rekombinante overføringsvektorer afledt  
fra pAc36C

Man konstruerede den rekombinante overførings-  
vektor pS42 i tre trin. Først fremstillede man pAc36C42  
ved at klonede det 1,46 kb lange XhoII/BglII fragment fra  
35 pPfc1028 (Holder et al, Nature, 317, 270-273, 1985) i  
BamH1 stedet på pAc36C. Derefter udskar man et 120 ba-

separfragment fra N-terminus af PMMSA fra pPfc1017 (Holder et al, 1985) ved fordøjelse med HindIII og AluI. Dette fragment indeholder en kort 12 basepar leader, et translationsinitiatieringskodon, det 18 aminosyrer lange PMMSA signalpeptid og 15 yderligere aminosyrer fra N-terminus af PMMSA. Dette blev underklonet i pUC9 fordøjet med HindIII og HindII og blev derefter udskåret som et HindIII/BamHI fragment, idet man tilve-  
5 jebragte BamHI stedet ved hjælp af en pUC9 polylinker. I det sidste kloningstrin klonede man dette 120 basepar BamHI/HindIII fragment i det unikke BamHI sted på p36-C42 med en syntetisk 10 basepar HindIII/BamHI linker, der også anbragte fusionen i den korrekte læseramme. Denne linker ses i figur 1. Genet er indført i  
10 pS42 under kontrol af polyhedrinpromotoren, og det vises i figur 2.

En anden rekombinant overføringsvektor pSC<sub>2642</sub> blev konstrueret ved ligering af tre fragmenter: det 1,15 kb lange BamHI/PstI fragment benyttet til kon-  
20 struktion af pPC<sub>2642</sub>, et 2,2 kb XhoI/BamHI fragment og et 7 kb XhoI/PstI fragment udskåret af pS42 og XhoI fordøjelse og delvis BamHI fordøjelse. Man konstruerede pPC<sub>2642</sub> på følgende måde:

(i) Man konstruerede en rekombinant overføringsvektor pP42, idet man omdannede HindIII stedet i pPfc1028 til BgIII ved fordøjelse ved HindIII, afstumpning med Klenowpolymerase og ligering af BglII linkere. Fordøjelse med XhoII gav et 1,46 kb XhoII/BglII fragment, der blev klonet i det unikke BamHI sted i pAc360 til  
30 opnåelse af fusion i læseramme af de første 10 aminosyrer fra polyhedrin med de C-terminale 293 aminosyrer fra PMMSA. Genet, der er inkorporeret i pP42, vises i figur 2. Dette gen står under kontrol af polyhedrinpromotoren.

35 (ii) Til konstruktion af pPC<sub>2642</sub> klonede man 26 kopier af CSP tetrapeptidgentagelsesstykket ved polyhe-

drin/PMMSA sammenføjnningen i pP42 ved erstatning af det lille BamHI/PstI fragment i pP42 med et 1,15 kb fragment opnået ved PstI fordøjelse og delvis BamHI fordøjelse af den bakterielle ekspressionsvektor 5 p750/CSPa/P195 (EP-A-0250261).

To yderligere rekombinante overføringsvektorer blev konstrueret med et syntetisk oligonukleotid til forhindring af ekspresion af den C-terminale ankersekvens fra PMMSA. Disse konstruktioner uden ankersekvens, pS42ΔA og pSC<sub>26</sub>ΔA, blev fremstillet ved konstruktion af en syntetisk 26 basepar PstI linker, der indeholdt dobbelttrettede translationsstopkodoner i alle læserammer. Denne linker vises i figur 1. Man klonede linkerens i det unikke PstI sted, både på pS42 og 15 pSC<sub>26</sub>42 lige før de antagne membranankersekvenser. Generne i pS42ΔA og pSC<sub>26</sub>42ΔA under kontrol af polyhedrinpromotoren vises i figur 2.

Alle kloningerne blev udført ved kendt teknik (Maniatis et al, "Molecular Cloning: A Laboratory 20 Manual", New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Man analyserede for korrekt ligering og orientering af fragmenterne ved en detaljeret restriktionsenzymkortlægning. Man oprensede plasmider til transficerings fra bakteriekulturer ved cæsiumchlorid gradient- 25 centrifugering.

### Eksempel 3

#### Fremstilling af rekombinante vira

30 Man dyrkede Spodoptera frugiperda (Sf) celler (IPLB Sf 21) (Vaughn et al, In vitro, 13, 213-217, 1977) i suspensionskultur ved 22°C eller 27°C i TC100 medium (Flow Labs) suppleret med 10% kalvefoster-serum (Gibco). Man propagerede AcNPV (stamme E2) i Sf 35 celler, dyrket ved 27°C i suspensionskulturer. Man frembragte rekombinante vira, der indeholdt P. falci-

parum gensekvenser, som vist i figur 2, ved cotransficer-  
ing i molforholdet 20:1 af de rekombinante overfø-  
ringsvektorer, fremstillet i eksempel 2, med AcNPV DNA,  
oprenset fra ekstra cellulære (ECV) viruskulturer i SF-  
5 celler. Fremgangsmåden til rensning af AcNPV DNA var  
som beskrevet (Summers og Smith, 1987), idet man dog  
inficerede kulturerne med 1 pfu pr. celle og indhøstede  
efter 6 dage og udelod trinnet med sucrosegradient. Co-  
transficeringen var som beskrevet (Summers og Smith,  
10 1987, metode 1).

De opnåede ECV blev gennem søgt for rekombinanter  
ved plakassay tre dage efter transficeringen. Man ud-  
førte plakassays i det væsentlige som beskrevet (Brown  
og Faulkner, J. Gen. Virol., 36, 361-364, 1977) under  
15 anvendelse af fortyndinger i række af supernatanten fra  
transficeringskulturen. Efter farvning med neutralrødt  
udvalgte man mulige rekombinante plakker på visuel ba-  
sis på baggrund af fravær af polyhedra, udprykkede dem  
i 0,5 ml dyrkningsmedium og rensede dem ved gentagne  
20 plakassay. Man mangedoblede rekombinante vira fra plak-  
ker eller monolagskulturer og dyrkede dem i større ska-  
la i suspension eller i rulleflasker. Det opnåede re-  
kombinante virus vises i figur 2.

25

#### Eksempel 4

##### Analyse af proteiner fra celler inficeret med rekombi- nante vira

Man undersøgte mulige rekombinante vira, frem-  
30 bragt i eksempel 3, for eksprimering af P. falciparum  
sekvenser ved dot blot assay. Man udprykkede polyhe-  
drinnegative plakker i 0,5 ml kulturmedium og lod dem  
undergå diffusion der i det mindste en time. 100 µl af  
dette medium blev benyttet til at inficere  $2 \times 10^5$   
35 celler i en 35 mm petriskål, og man inkuberede ved  
stuetemperatur i en time. Inokulatet blev derefter er-

stattet med 1 ml dyrkningsmedium og man inkuberede pladerne 3-4 dage ved 27°C. Cellerne blev vasket én gang i phosphatpufret saltvand (PBS) og fracentrifugeret. Cel-  
lebundfaldet blev lyseret i 1% natriumdodecylsulfat  
5 (SDS) og anbragt på nitrocellulosefiltre under vakuum ved anvendelse af et dot blot apparat.

Til påvisning af udskilte proteiner erstattede man mediet med 0,5 ml serumfrit medium 3 dage efter infektionen og satte 100 µl direkte på nitrocellulosen  
10 efter 24 timers inkubering ved 27°C. Man undersøgte filtrene med et kanin polyklonalt antiserum dyrket mod nativ PMMSA og derefter med et alkalisk phosphatasekonjugeret antikanin IgG antistof (Sigma). Man påviste binding af antistoffer med et kromogent substrat.

15 Man benyttede til mere detaljeret analyse af cellelysater og supernatanter fra kulturerne SDS/polyacrylamid gelelektroforese (PAGE) under reducerende og ikke reducerende betingelser, hvorefter man farvede med Coomassie blåt eller udførte Western blot med en række  
20 specifikke antisera og monoklonale stoffer. Herved benyttede man to polyklonale kaninantisera, det ene, (Pas PMMSA), dyrket mod nativ PMMSA, og det andet, (Pas NANP), dyrket mod et syntetisk peptid, der svarede til tetrapeptidgentagelsen (NANP) fra CSP, bundet til ser-  
25 umalbumin fra kvæg, og adskillige musemonoklonale antistoffer imod nativ PMMSA, og som genkendte konformationelle reduktionsfølsomme epitoper ved C-terminus (Mab 111.4, Mab 117,2 og Mab 111,2).

Dot blot analyse tydede på, at antigene produk-  
30 ter, der blev genkendt af Pas PMMSA, blev eksprimeret af begge de rekombinante vira vS42 og vSC<sub>26</sub>42 i inficerede Sf celler. Celler inficeret med vS 42 producerede nyt protein, der ikke kunne ses på geler farvet med Coomassie blåt, men uden videre kunne påvises ved Wes-  
35 tern blot som et 36-38kd protein, der forekom som tre adskilte bånd, der blev genkendt af Pas PMMSA, og mere

tydeligt af Mab 111.4 under ikke reducerende betingelser. vSC<sub>26</sub>42 inficerede celler producerede også et nyt protein på ca. 50 kd, der også vandrede som tre tætliggende bånd. Dette 50kd protein kunne tydeligt ses ved  
5 Coomassiefarvning ved samme ekspressionsniveau som for produktet fra vP42 og blev kraftigt genkendt af Pas PMMSA, Pas NANP, Mab 111.4, Mab 111.2 og Mab 117.2. De monoklonale stoffer genkendte som ventet kun proteinerne under ikke reducerende betingelser og genkendelsen  
10 af begge af Pas PMMSA var stærkere med det ikke reducerede protein. Begge de rekombinante produkter var uopløselige i Nonidet P40 (NP40), Rennex (RX) og desoxycholat (DOC), men kunne opløses i cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) og SDS. Udbyttet af fusionsproteinerne  
15 var < 1 µg/ml og 10-20 µg/ml for henholdsvis vS42 og vSC<sub>26</sub>42.

For begge rekombinante vira vS42ΔA og vSC<sub>26</sub>42ΔA viste dot blot analyse, at både cellerne og supernatanten fra inficerede kulturer indeholdt antigene produkter, der blev genkendt af Pas PMMSA. Analyse ved  
20 SDS/PAGE viste nye proteiner på 36-38 kd for vS42ΔA og på ca. 50kd for vSC<sub>26</sub>42ΔA eksprimeret i niveauer, der let kunne ses fire dage efter infektionen i geler farvet med Coomasie blå ved cellelysate (ca. 1-2 µg i 1  
25 x 10<sup>5</sup> celler) og også i supernatanten fra kultur ved tilsvarende niveauer.

Både de udskilte og ikke udskilte former af de rekombinante proteiner udviste flerdobbelte bånd ved PAGE, som man så for produkterne eksprimeret af vS42 og  
30 vSC<sub>26</sub>42, og begge kunne genkendes af Pas PMMSA, Mab 111.4, Mab 111.2 og Mab 117.2; og 50kd produktet fra vSC<sub>26</sub>42ΔA kunne også genkendes af Pas NANP. Man så kun genkendelse ved Mabs under ikke reducerende betingelser, og genkendelsen af Pas PMMSA var kraftigere i ikke  
35 reduceret tilstand. Begge de rekombinante produkter blev fundet i den opløselige fraktion af celleekstrak-

ten, og de udskilte former var fuldstændig opløselige. Udbyttet af fusionsproteinerne var 7,5 µg/ml og 10 µg/ml for henholdsvis vS42ΔA og vSC<sub>26</sub>42ΔA.

5

Eksempel 5Ekspression af det store umiddelbare tidlige (IE) gen fra human cytomegalovirus (HCMV) i forskellige baculovirusvektorer

10 Det vigtige umiddelbare tidlige gen fra HCMV koder for et sammensplejset molekyle på 1736 nukleotider, der omfatter 4 exoner og giver et protein med en molekylvægt ifølge SDS-PAGE på 72-76K. Man gennemskar umiddelbart tidlig cDNA klonet i pUC9 (Akrigg et al, 1985, 15 Virus Research, 2, 107-121) med BamHI til frigivelse af et fragment, der indeholdt hele den kodende sekvens plus ca. 145bp af 5'-ikke translateret ledersekvens og 90bp af 3'-ikke translateret sekvens. Dette fragment blev gelrenset og klonet i BamHI fordøjet phosphatase- 20 behandlet DNA fra baculovirus overføringsvektorerne pAc373 og pAc36C.

Man fremstillede rekombinante baculovirus ved cotransficering af plasmid og vild-type AcNPV DNA i Spodoptera frugiperda celler. Man isolerede rekombinan- 25 te baculovira, der stammede fra homolog rekombinering ved visuel gennemsøgning for inklusionsnegative plakker og rensede dem derefter to gange ved plak-rensning.

Man analyserede sammenlignelige ekspressionsniveauer ved <sup>35</sup>S-methioninmærkning, SDS-PAGE, Western 30 Blot og ELISA.

i) <sup>35</sup>S-methioninmærkning: Man inficerede Spodoptera frugiperda celler (2 x 10<sup>6</sup> celler/3 cm skål) med en m.o.i. (multipel infektion) på 2 og inkuberede ved 28°C. Efter 24 timers forløb rensede man cellerne 2 35 gange med PBS og mærkede dem i 1 time i methioninfrit TC100 med indhold af 10 µCi/ml <sup>35</sup>S-methionin. Efter

mærkningen vaskede man cellerne 3 gange i PBS og analyserede totale cellelysater ved SDS-PAGE ( $10^6$  celler/spor) og autoradiogrammer.

Resultaterne vises i figur 3. I figur 3 refererer tidspunkterne 24, + 4 og + 24 til en første 24 timers puls med  $^{35}\text{S}$ -methionin fulgt af en 4 timers og 24 timers efterbehandling med ikke mærket methionin. Tidspunktet 48 refererer til en 48 timers puls med  $^{35}\text{S}$ -methionin. U betegner ikke inficerede celler.

Densitometrisk analyse viser, at niveauerne for methionininkorporering i rekombinante produkter er 4-5 gange større med pAc36C (36C-IE) end med pAc373 (373-IE).

ii) SDSPAGE/Coomassie blåt farvning: Man farvede også gelen fra (i) til undersøgelse af total proteinindhold under anvendelse af Coomassie blåt. Resultaterne vises i figur 4. Det kan ses, at mængden af rekombinant protein i pAc36C sporet (36C-IE) er meget større end i pAc373 sporet (373-IE).

20

#### Eksempel 6

##### Ekspression af en færdig intracellulær form for human $\gamma$ -interferon

Man udskar et 852 bp AvaII-NcoI fragment fra pIFN $\gamma$ -G4 (Nishi et al, J. Biochem. 97, 153-159, 1985) og modificerede det i begge ender med BamHI linkere. Dette fragment blev underklonet i det unikke BamHI sted på pAc36C til dannelse af pAc36C-11. Fra dette udskar man hele  $\gamma$ -interferon cDNA som et 2,74kb Sal I-Hind III fragment og klonede det i de homologe steder i polylinkeren på RF M13mp18. De 2,74kb Sal I-Hind III steder var fra Sal I stedet ca. 820 bp før det muterede ATG til ATC translationsinitieringskodon for polyhedringenet til Hind III stedet, ca. 500bp efter translations-

termineringskodonet for polyhedringenet. Man benyttede

35

den rekombinante M13 klon til at danne enkeltstrengsskabelonen. Denne blev fæstet til en 33mere oligonukleotid med sekvensen

5 TACATATGGGTCCTGCATCCCGATGGTGGGACG

Man benyttede dette oligonukleotid til præcist at sammensmelte 5'-polyhedrinsekvensen fra pAc36C til et ATG translationsinitieringskodon fulgt af sekvensen  
10 for den færdige, ikke udskilte form for human  $\gamma$ -interferon. Dette illustreres nedenfor med det 33mere sletningsoligonukleotid understreget:

Polyhedrin- N-terminus for polyhedringenområdet  
15 leader nu som forlænget leader

ACCTATAAAT

ATCCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGG

Færdig form for  
20  $\gamma$ -interferon

ATG CAG GAC CCA TAT GTA

Man benyttede et mutagenesesæt fra Amersham International til at udføre sletningsmutagenesen. Man identificerede rekombinante M13 plakker ved hybridisering med det 33mere oligonukleotid, der var kinaseret med [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ -ATP. Man udprykkede positive plakker, plakrensede dem og benyttede dem til fremstilling af enkeltstrengsskabeloner til DNA sekvensopdeling til bekræftelse af, at den korrekte sletning havde fundet sted. Man benyttede RF formen for en positiv klon til at udskære et 135bp EcoRV-Nde I fragment, der omfattede sletningen. Dette blev derefter benyttet i en 3 fragmentligering, der bestod af det store EcoRV-BamHI fragment fra pAc373, det 135bp EcoRV-Nde I fragment, be-

skrevet ovenfor og et 585bp Nde 1-Bam H1 fragment, der udgjorde resten af  $\gamma$ -interferongenet.

Man benyttede den således frembragte rekombinante overføringsvektor (benævnt p181) til at fremstille en rekombinant AcNPV som beskrevet i eksempel 3. Efter infektion af Sf celler med en m.o.i. på 5 pfu pr. celle, indhøstede man cellerne 48 timer efter infektionen, vaskede med PBS puffer, lyserede og kørte på en SDS polyacrylamidgel, hvorefter man farvede med Coomassie blå. De farvede spor på gelen vises i figur 5, hvor spor 1: ikke inficerede celler; spor 2: celler inficeret med vild-type AcNPV; spor 3: celler inficeret med rekombinant AcNPV afledt fra p181; og spor 4: proteinmolekylvægtmarkører. En densitometrisk gennemsøgning gav, at det intracellulære humane  $\gamma$ -interferonbånd havde 14% af total celleprotein i disse celler.

## P A T E N T K R A V

1. Baculovirus overføringsvektor, der indeholder  
5 et gennemskæringssted, i hvilket et fremmed gen kan  
klones, kort efter N-terminus for polyhedringenomområ-  
det, k e n d e t e g n e t ved, at det naturligt fore-  
kommende ATG translationsstartkodon for polyhedringenet  
ikke forefindes, idet den N-terminale polyhedrinkodende  
10 sekvens før gennemskæringsstedet bevares, men ikke kan  
translateres.

2. Vektor ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t  
ved, at gennemskæringsstedet tilvejebringes efter de  
første 27-39 baser af den N-terminale region for poly-  
15 hedringenet.

3. Vektor ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t  
ved, at gennemskæringsstedet tilvejebringes efter de  
første 33 baser.

4. Vektor ifølge et hvilket som helst af de for-  
20 rige krav, k e n d e t e g n e t ved, at gennemskæ-  
ringsstedet er et BamH1-sted.

5. Vektor ifølge et hvilket som helst af de for-  
rige krav, k e n d e t e g n e t ved, at der er en en-  
kelt baseændring i den tredje base i det naturligt fo-  
25 rekommende ATG translationsstartkodon for polyhedringe-  
net.

6. Vektor ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t  
ved, at ATG-kodonet er ændret til ATC.

7. Fremgangsmåde til fremstilling af en rekombi-  
30 nant baculovirus, der inkorporerer et fremmed gen,  
hvorved man

(a) kloner et fremmed gen forsynet med et translations-  
startkodon i en baculovirus overføringsvektor i et  
gennemskæringssted kort efter N-terminus for poly-  
35 hedringenomområdet; og

(b) cotransficerer insektceller, der er modtagelige for

baculovirusinfektion, med den rekombinante baculovirus overføringsvektor opnået i trin (a) og med intakt vild-type baculovirus DNA,

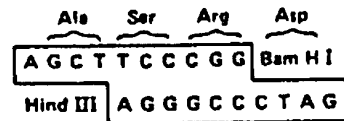
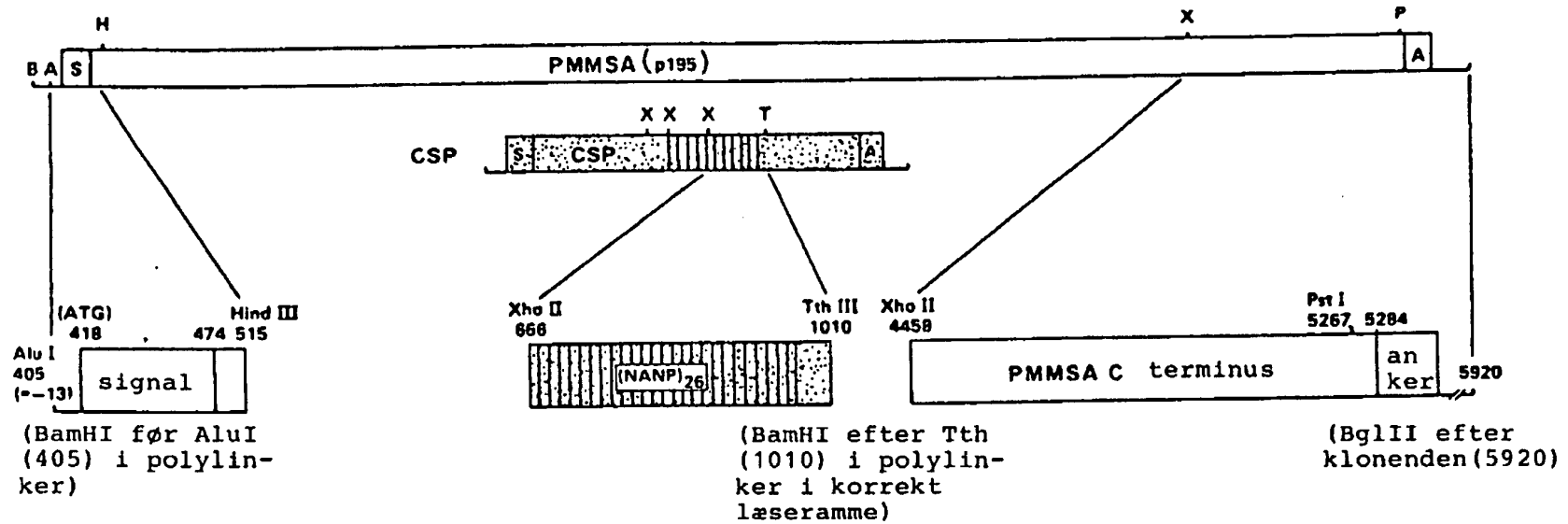
k e n d e t e g n e t ved, at man som baculovirus  
5 overføringsvektor benytter en vektor ifølge et hvilket som helst af de forrige krav.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at det fremmede gen er et prokaryotisk gen.

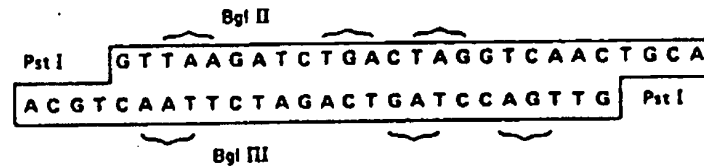
10 9. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at det fremmede gen er et eukaryotisk gen.

10. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 7-9, k e n d e t e g n e t ved, at man yderligere dyrker celler, der er modtagelige for baculovirusinfektion, og som er inficeret med den således producerede rekombinante baculovirus, til opnåelse af eksprimering af det produkt, det fremmede gen koder for.

Fig. 1.

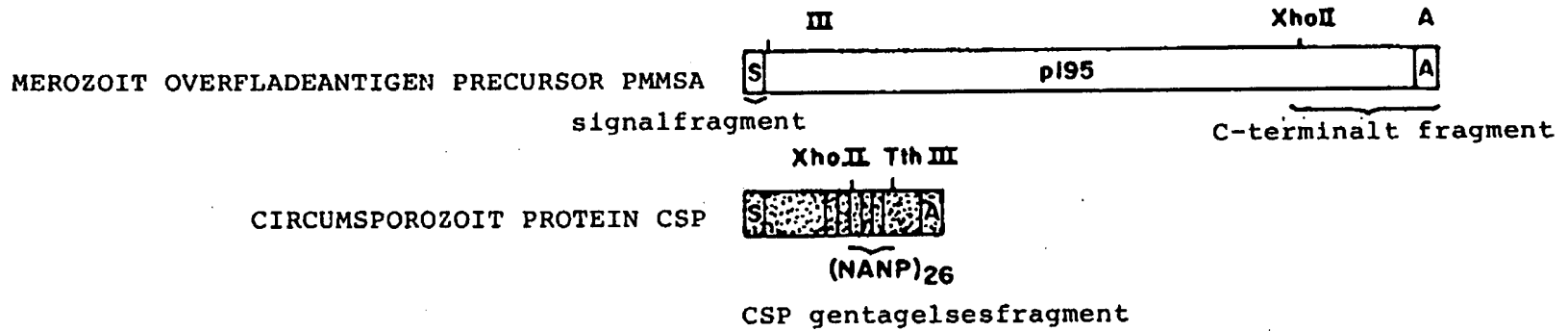


Linker til fusion i ramme af HindIII(515) med XhoII(666) CSP eller XhoII(4458) PMMSA



Dobbeltrettet flerramme stop-linker til sletning af ankersekvens ved PstI(5267)

Fig. 2.



Gen	Overfø- ringsvkt	Rekombin. ovf.vkt.	Rekombin. baculovir.	Nedbrydning	Tertiær struktur
p195 signal/ p195 C-terminus	pAc36C	pS42	S42	intakt	korrekt foldning
p195 signal/CSPgentagelse/p195 C-term.	pAc36C	pSC <sub>26</sub> 42	SC <sub>26</sub> 42	intakt	korrekt foldning
p195 signal/p195 C-terminus/anker slet.	pAc36C	pS42ΔA	S42 ΔA	intakt	korrekt foldning
p195 signal/CSP gentag- else/p195 C-terminus/anker slettet	pAc36C	pSC <sub>26</sub> 42ΔA	SC <sub>26</sub> 42 ΔA	intakt	korrekt foldning

Fig.3.

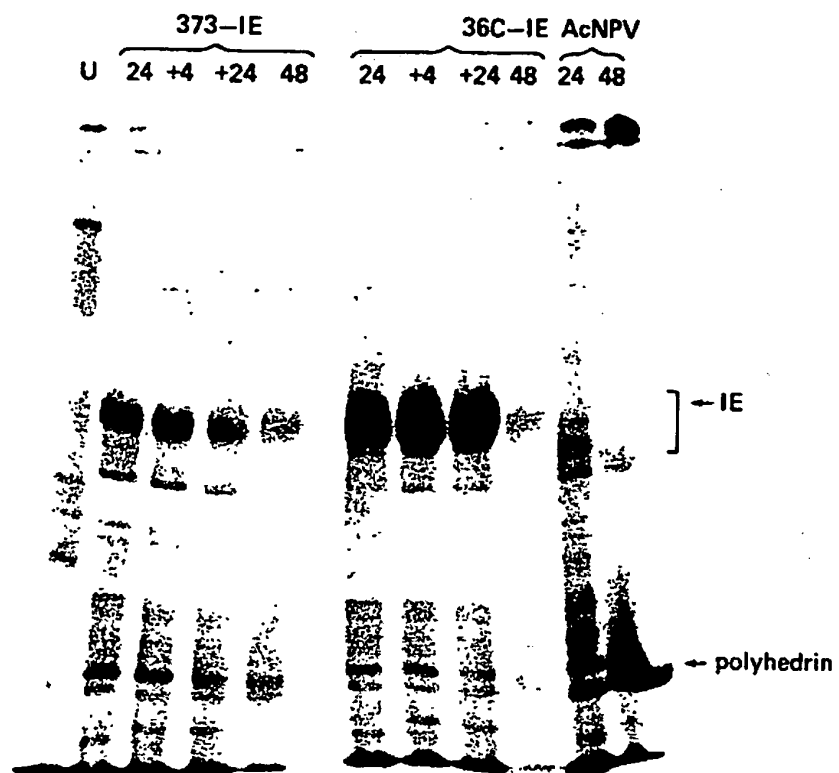
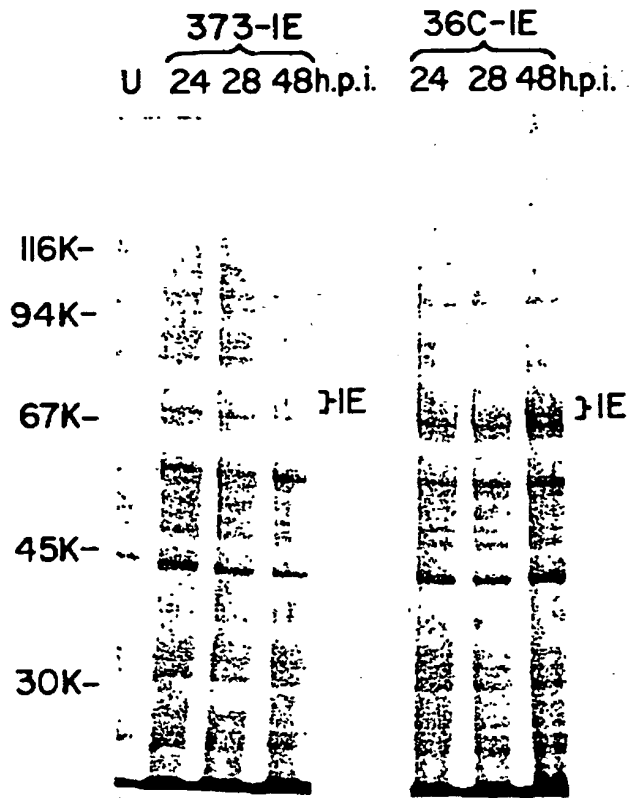


Fig.4.



*Fig. 5.*

