



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07K 13/00, A61K 37/02 C12P 21/02	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/19089 (43) Date de publication internationale: 30 septembre 1993 (30.09.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00273 (22) Date de dépôt international: 18 mars 1993 (18.03.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/03224 18 mars 1992 (18.03.92) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69000 Lyon (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : POYART, Claude [FR/FR]; 67, rue Croulebarbe, F-75013 Paris (FR). PAGNIER, Renée, Josée [FR/FR]; 8, rue Jean-Monnet, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre (FR). EDELSTEIN, Stuart [US/CH]; 26, avenue de Miremont, CH-1206 Genève (CH).		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, BR, CA, FI, HU, JP, PL, RU, UA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: OXYGEN CARRIER (54) Titre: TRANSPORTEUR D'OXYGENE (57) Abstract Oxygen carrier comprising four almost identical globine-type polypeptide chains, capable of associating or being associated with one another so as to achieve a reversible oxygen fixation activity. (57) Abrégé La présente invention concerne un transporteur d'oxygène du type comportant quatre chaînes polypeptidiques de type globine, pratiquement identiques, susceptibles de s'associer ou d'être associées entre elles afin d'assurer une activité de fixation réversible de l'oxygène.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

TRANSPORTEUR D'OXYGENE.

La présente invention concerne des transporteurs d'oxygène ayant une structure similaire à l'hémoglobine et qui peuvent être utilisés comme substitut sanguin possédant une affinité réduite pour l'oxygène.

La médecine d'urgence requiert de grandes quantités de sang en vue de la transfusion. Outre le problème d'approvisionnement et de stockage pouvant se poser, les transfusions font courir des risques de transmission de maladies infectieuses identifiées ou non et nécessitent, par là même, l'utilisation de procédés d'inactivation virale toujours délicats à mettre en oeuvre sur des protéines.

Il est donc souhaitable de pouvoir disposer d'un transporteur d'oxygène artificiel pouvant être substitué au sang dans un usage transfusionnel.

C'est l'objet de la présente invention qui propose des transporteurs d'oxygène ayant des structures proches de celle de l'hémoglobine humaine (HbA).

L'hémoglobine est le constituant principal du globule rouge, elle a pour fonction essentielle de fixer, transporter et délivrer la quantité d'oxygène nécessaire au fonctionnement normal des tissus.

La molécule d'hémoglobine comporte deux parties, une partie protéique, la globine, et des groupements qui abritent des atomes de fer ferreux responsables de la fixation de l'oxygène, l'hème. La globine est un tétramère composé de quatre chaînes identiques deux à deux qui sont nommées, pour les chaînes peptidiques de 141 amino-acides, alpha, et pour les chaînes de 146 amino-acides, chaînes de type bêta ; pour cette raison la globine humaine normale est notée $\alpha_2 \beta_2$.

Le terme de chaîne de type bêta, ou "non alpha", recouvre, non seulement les chaînes bêta, mais également les chaînes dénommées epsilon, gamma ou delta.

A chacune des chaînes polypeptidiques est lié un groupe héminique.

Normalement chez l'adulte, plus de 95 % de l'hémoglobine sont constitués par du tétramère $\alpha_2 \beta_2$, c'est-à-dire l'association de deux dimères hétérologues alpha-bêta, associés au complexe catalytique,

l'hème, c'est-à-dire, l'hémoglobine A. On trouve 2 % à 3 % d'une hémoglobine constituée de tétramères $\alpha_2\delta_2$, et des traces d'hémoglobine foetale $\alpha_2\gamma_2$.

5 La globine étant constituée par des chaînes protéiques, il était tentant d'essayer de préparer ces chaînes par des techniques mettant en oeuvre les ADN recombinants.

10 Les techniques mises en oeuvre ont eu essentiellement pour but de faire synthétiser, par des organismes divers, les chaînes alpha et bêta, ce qui conduit à des procédés lourds d'expression séparée de chacune des chaînes ou des procédés mettant en oeuvre des systèmes de co-expression dont les résultats sont souvent peu satisfaisants.

Ainsi, la demande de brevet WO 88/09179 a proposé ce type d'approche, à savoir la synthèse séparée des chaînes alpha et des chaînes bêta, en particulier sous forme de mutants non naturels.

15 L'approche s'étant révélée relativement lourde, une demande de brevet plus récente, WO 90/13645, a proposé d'utiliser directement un dimère notamment de chaînes alpha destinées à être combinées avec des chaînes bêta.

20 Bien que cette approche soit intéressante, elle nécessite, là encore, l'obtention séparée de séquences alpha et de séquences bêta qui doivent être recombinées, même si celles-ci peuvent se présenter chacune sous forme de dimère afin de permettre la formation d'un tétramère stable.

25 La présente invention a pour objet un transporteur d'oxygène qui ne nécessite la synthèse que d'un seul type de chaîne, ce type de chaîne pouvant être associé sous forme d'un tétramère portant l'hème et capable de fixer de façon réversible l'oxygène.

30 Plus particulièrement, la présente invention concerne un transporteur d'oxygène du type comportant au moins quatre chaînes polypeptidiques de type globine pratiquement identiques, susceptibles de s'associer ou d'être associées entre elles en incorporant l'hème, afin d'assurer une activité de fixation réversible de l'oxygène.

Dans la définition précédente, il faut entendre que par la terminologie "chaînes polypeptidiques de type globine" on se réfère aux chaînes de type alpha ou aux chaînes de type bêta, et que ces chaînes sont pratiquement identiques, de préférence sont totalement identiques.

5 Ce type de transporteur se distingue donc des transporteurs de la technique antérieure dans lesquels on prévoit toujours deux types de chaînes distinctes qui sont susceptibles de s'associer, comme par exemple des chaînes alpha et bêta, même si, au demeurant, ces chaînes comportent certaines modifications ou se présentent sous forme de dimère.

10 Le transporteur d'oxygène selon la présente invention peut présenter deux modes de réalisation différents.

Dans un premier mode de réalisation, les quatre chaînes polypeptidiques sont identiques et leur structure qui emprunte aux chaînes alpha et aux chaînes de type bêta, est telle qu'elles vont pouvoir s'associer en reconstituant une interface similaire à l'interface $\alpha_1\beta_2$ qui intervient dans l'association des chaînes alpha et des chaînes bêta de l'HbA naturelle.

15 Dans un second mode de réalisation, les chaînes sont identiques et sont, en particulier, toutes des chaînes bêta qui vont être associées, sous forme d'un tétramère.

20 Plus particulièrement, dans le premier mode de réalisation, la présente invention concerne des transporteurs d'oxygène artificiels tels que décrits précédemment, comportant au moins quatre chaînes polypeptidiques incorporant l'hème et ayant chacune une structure de type globine séquencée :

V - (W) - X - (Y) - Z

dans laquelle :

- V, X, et Z sont des séquences polypeptidiques de type globine, et
- 30 - (W) et (Y) sont deux séquences polypeptidiques complémentaires susceptibles d'interagir pour constituer une interface qui, lorsqu'elle appartient à deux chaînes distinctes, est au moins en partie similaire à

l'interface $\alpha_1\beta_2$, lesdites chaînes pouvant s'associer en reconstituant ladite interface similaire à l'interface $\alpha_1\beta_2$ afin d'assurer une activité de fixation réversible et coopérative de l'oxygène.

5 Dans ce type de transporteur d'oxygène selon l'invention, les quatre chaînes polypeptidiques associées dans un tétramère, sont associées "tête-bêche" afin que la mise en regard des séquences W_1 de l'une des chaînes avec la séquence Y_2 de l'autre chaîne conduise, parallèlement, à la mise en rapport de la séquence Y_1 de la première avec la séquence W_2 de la seconde pour reconstituer au moins en partie l'interface $\alpha_1\beta_2$ de l'hémoglobine naturelle.

10 Cette interface entre les chaînes alpha et les chaînes bêta est impliquée dans la transition conformationnelle responsable en partie de la fixation et de la libération de l'oxygène, sa reconstitution permet d'obtenir des transporteurs d'oxygène ayant des propriétés satisfaisantes.

15 Bien entendu, les chaînes polypeptidiques devront présenter des structures qui les rapprochent des chaînes de type alpha ou des chaînes de type bêta.

Ainsi, notamment, la séquence polypeptidique de type globine X comportera un ou plusieurs segments hélicoïdaux choisis parmi les segments hélicoïdaux D, E et F des chaînes de type alpha ou bêta, lesdits segments pourront être reliés entre eux par des segments non hélicoïdaux ou par des liaisons simples.

20 La séquence polypeptidique de type globine V comportera un ou plusieurs segments hélicoïdaux choisis parmi les segments hélicoïdaux A, B et C des chaînes de type alpha ou bêta, lesdits segments pourront être reliés entre eux par des segments non hélicoïdaux ou par des liaisons simples.

25 La séquence polypeptidique de type globine Z comportera un ou plusieurs segments hélicoïdaux choisis parmi les segments hélicoïdaux G et H des chaînes de type alpha ou bêta, lesdits segments pourront être reliés entre eux par des segments non hélicoïdaux ou par des liaisons simples.

Mais, s'il est clair que les segments hélicoïdaux jouent un rôle important dans la structure du tétramère normal et qu'il faudra retrouver ce type de structure dans le tétramère synthétique, il est toutefois possible de prévoir l'association de segments hélicoïdaux d'origine différente, c'est-à-dire soit de type alpha, soit de type bêta, quant aux segments non hélicoïdaux, ils peuvent être des segments ayant la structure de leurs homologues naturels et/ou être de nature différente même si, au demeurant, l'utilisation de séquences homogènes tout alpha ou tout bêta peut être préférée.

De façon préférentielle, les segments de la formule générale seront choisis de la manière suivante :

$$V \text{ alpha} = NA + A + AB + B + C$$

$$W \text{ alpha} = CE \text{ (interface } \alpha_1/\beta_2\text{)}$$

$$X \text{ alpha} = E + EF + F$$

$$Y \text{ alpha} = FG \text{ (interface } \alpha_1/\beta_2\text{)}$$

$$Z \text{ alpha} = G + GH + H + HC$$

$$V \text{ bêta} = NA + A + B + C$$

$$W \text{ bêta} = CD \text{ (interface } \alpha_1/\beta_2\text{)}$$

$$X \text{ bêta} = D + E + EF + F$$

$$Y \text{ bêta} = FG \text{ (interface } \alpha_1/\beta_2\text{)}$$

$$Z \text{ bêta} = G + GH + H + HC$$

Enfin, l'interface $\alpha_1 \beta_2$ telle qu'elle peut être reconstituée par les chaînes séquencées selon la présente invention est de préférence la suivante :

	(C2 36Pro	Val96	G3)	
	(C3 37Trp	Pro95	G2)	
W(bêta-alpha) ₁	(C6 40Arg	Asp91	G1)	Y(bêta-alpha) ₂
	(C7 41Phe	Val93	FG5)	
		Arg92	FG4)	
		Leu91	FG3)	

		(FG3 91Leu			
		(FG4 92Arg			
		(FG5 93Val	Phe41	C7)	
5	Y(bêta-alpha) ₁	(G1 94Asp	Arg40	C6)	W(bêta-alpha) ₂
		(G2 95Pro	Trp37	C3)	
		(G3 96Val	Pro36	C2)	

En outre, les différents segments hélicoïdaux ou non pourront également comporter des mutations par rapport à leurs homologues naturels, comme cela sera décrit ci-après.

10 Ces mutations concernent de manière préférée la sous-unité de type bêta, plus stable. On peut citer plus particulièrement les mutations suivantes de la chaîne de type bêta :

- remplacement de His en position 2 par Met
- remplacement de Val en position 23 par Ile (Pagnier et al, 1990)
- 15 - remplacement de Ala en position 27 par Ser (Baklouti et al, 1986 ; Fessas et al, 1982 ; Huang et al, 1990)
- remplacement de Phe en position 41 par Tyr
- remplacement de His en position 63 par Phe (Lin et al, 1990 ; Nagai et al, 1987, 1988)
- 20 - remplacement de His en position 63 par Ile (Lin et al, 1990 ; Nagai et al, 1987, 1988)
- remplacement de Val en position 67 par Phe (Lin et al, 1990 ; Nagai et al, 1987, 1988)
- remplacement de Val en position 67 par Ile (Lin et al, 1990 ; Nagai et al, 1987, 1988)
- 25

De telles mutations permettent de diminuer l'affinité intrinsèque du transporteur pour l'oxygène, tout en maintenant un effet de coopérativité.

30 D'autres mutations ont également été décrites et peuvent très bien être incorporées dans les hémoglobines selon la présente invention. Il peut s'agir notamment de l'une ou de plusieurs des mutations figurant au tableau 1 ci-après.

Tableau 1

Variants naturels de l'Hb humaine présentant une diminution de l'affinité pour l'oxygène

5

Mutants de la chaîne α

10	Hémoglobine	mutation	Références
	Torino	$\alpha 43$ (CE1) Phe $\rightarrow$ Val	Beretta <i>et al</i> , 1968
	Hirosaki	$\alpha 43$ (CE1) Phe $\rightarrow$ Leu	Ohba <i>et al</i> , 1975a
15	Moabit	$\alpha 86$ (F7) Leu $\rightarrow$ Arg	Knuth <i>et al</i> , 1979
	Sétif	$\alpha 94$ (G1) Asp $\rightarrow$ Tyr	Wajcman <i>et al</i> , 1972
	Titusville	$\alpha 94$ (G1) Asp $\rightarrow$ Asn	Schneider <i>et al</i> , 1975a

20

Mutants de la chaîne β

	Hémoglobine	mutation	Références
	Raleigh	$\beta 1$ (NA1) Val $\rightarrow$ ac-Ala	Moo-Penn <i>et al</i> , 1977
25	Connecticut	$\beta 21$ (B3) Asp $\rightarrow$ Gly	Moo-Penn <i>et al</i> , 1981
	Moscva	$\beta 24$ (B6) Gly $\rightarrow$ Asp	Idelson <i>et al</i> , 1974
	Auckland	$\beta 25$ (B7) Gly $\rightarrow$ Asp	Williamson <i>et al</i> , 1987
30	Knossos	$\beta 27$ (B9) Ala $\rightarrow$ Ser	Baklouti <i>et al</i> , 1986; Fessas <i>et al</i> , 1982
	Rothschild	$\beta 37$ (C3) Trp $\rightarrow$ Arg	Gacon <i>et al</i> , 1977
	Hazebrouck	$\beta 38$ (C4) Thr $\rightarrow$ Pro	Blouquit <i>et al</i> , 1984
	Hammersmith	$\beta 42$ (CD1) Phe $\rightarrow$ Ser	Dacie <i>et al</i> , 1967; Ohba <i>et al</i> , 1975b
35	Bucuresti	$\beta 42$ (CD1) Phe $\rightarrow$ Leu	Bratu <i>et al</i> , 1971; Keeling <i>et al</i> , 1971

Tableau 1 (suite)

	Sendagi	$\beta 42$ (CD1) Phe $\rightarrow$ Val	Ogata <i>et al.</i> , 1986
	Chervely	$\beta 45$ (CD4) Phe $\rightarrow$ Ser	Yeager <i>et al.</i> , 1983
5	Okaloosa	$\beta 48$ (CD7) Leu $\rightarrow$ Arg	Charache <i>et al.</i> , 1973
	Bologna	$\beta 61$ (E5) Lys $\rightarrow$ Met	Marinucci <i>et al.</i> , 1981
	J-Cairo	$\beta 65$ (E9) Lys $\rightarrow$ Gln	Garel <i>et al.</i> , 1976
	Chico	$\beta 66$ (E10) Lys $\rightarrow$ Thr	Shih <i>et al.</i> , 1987
10	Bristol	$\beta 67$ (E11) Val $\rightarrow$ Asp	Steadman <i>et al.</i> , 1970
	Seattle	$\beta 70$ (E14) Ala $\rightarrow$ Asp	Kurachi <i>et al.</i> , 1973
	Vancouver	$\beta 73$ (E17) Asp $\rightarrow$ Tyr	Jones <i>et al.</i> , 1976
	Korle-Bu	$\beta 73$ (E17) Asp $\rightarrow$ Asn	Konotey-Ahulu <i>et al.</i> , 1968; Wajcman & Jones, 1977
15	Mobile	$\beta 73$ (E17) Asp $\rightarrow$ Val	Schneider <i>et al.</i> , 1975b
	Tilburg	$\beta 73$ (E17) Asp $\rightarrow$ Gly	Bernini & Giordano, 1988
	Aalborg	$\beta 74$ (E18) Gly $\rightarrow$ Arg	Williamson <i>et al.</i> , 1990
20	Calais	$\beta 76$ (E20) Ala $\rightarrow$ Pro	Wajcman <i>et al.</i> , 1991
	Providence	$\beta 82$ (EF6) Lys $\rightarrow$ Asn $\rightarrow$ Asp	Bonaventura <i>et al.</i> , Moo-Penn <i>et al.</i> , 1976
	Pyrgos	$\beta 83$ (EF7) Gly $\rightarrow$ Asp	Tatsis <i>et al.</i> , 1976
	Agenogi	$\beta 90$ (F6) Glu $\rightarrow$ Lys	Miyaji <i>et al.</i> , 1966
25	Roseau- Point-e à Pitre	$\beta 90$ (F6) Glu $\rightarrow$ Gly	Mérault <i>et al.</i> , 1985
	Caribbean	$\beta 91$ (F7) Leu $\rightarrow$ Arg	Ahern <i>et al.</i> , 1976
	Kansas	$\beta 102$ (G4) Asn $\rightarrow$ Thr	Bonaventura & Riggs, 1968
30	Beth Israel	$\beta 102$ (G4) Asn $\rightarrow$ Ser	Nagel <i>et al.</i> , 1976
	Saint- Mandé	$\beta 102$ (G4) Asn $\rightarrow$ Tyr	Arous <i>et al.</i> , 1981
	Burke	$\beta 107$ (G9) Gly $\rightarrow$ Arg	Turner <i>et al.</i> , 1976
	Yoshizuka	$\beta 108$ (G10) Asn $\rightarrow$ Asp	Imamura <i>et al.</i> , 1969
35	Presbyterian	$\beta 108$ (G10) Asn $\rightarrow$ Lys	Moo-Penn <i>et al.</i> , 1978

Tableau 1 (suite)

5	Peterborough	$\beta 111$ (G13) Val $\rightarrow$ Phe	King <i>et al</i> , 1972
	New-York	$\beta 113$ (G15) Val $\rightarrow$ Glu	Ranney <i>et al</i> , 1967
	D-Punjab	$\beta 121$ (GH4) Glu $\rightarrow$ Gln	Baglioni, 1962
	La Desirade	$\beta 129$ (H7) Ala $\rightarrow$ Val	Mérault <i>et al</i> , 1986
10	Yamagata	$\beta 132$ (H10) Lys $\rightarrow$ Asn	Harano <i>et al</i> , 1990
	Hope	$\beta 136$ (H14) Gly $\rightarrow$ Asp	Minnich <i>et al</i> , 1965
	Himeji	$\beta 140$ (H18) Ala $\rightarrow$ Asp	Ohba <i>et al</i> , 1986

15

NB : n'ont été pris en compte que les hémoglobines
contenant une seule mutation soit dans la sous-
unité α , soit dans la sous-unité β .

20

25

30

35

Comme cela a été indiqué précédemment, les séquences W et Y doivent permettre de reconstituer une interface $\alpha_1 \beta_2$ de HbA ou similaire qui est impliquée dans la transition $R \rightarrow T$. C'est pourquoi, les segments (W) et (Y) seront similaires aux segments C/CD et FG/G de l'interface $\alpha_1 \beta_2$ de l'hémoglobine humaine, mais il est possible de la modifier si besoin est en prévoyant certaines mutations ponctuelles.

Les éléments essentiels impliqués dans la structure de l'interface $\alpha_1 \beta_2$ sont les suivants :

10	<u>Chaîne</u>	<u>Chaîne</u>	<u>Chaîne</u>	<u>Chaîne</u>
	<u>Bêta</u>	<u>Alpha</u>	<u>Bêta</u>	<u>Alpha</u>
	37Trp	38Thr	Tyr145	Tyr140
	40Arg	41Thr	Asn102	Asn97
15	41Phe	42Tyr	Glu101	Val96
	96Leu	91Leu	Asp99	Asp94
	97His	92Arg	His97	Arg92
	98Val	93Val	Phe41	Tyr42
	99Asp	94Asp	Arg40	Thr41
20	100Pro	95Pro	Gln39	Lys40
	101Glu	96Val	Trp37	Thr38
	145Tyr	140Tyr	Pro36	Pro37

25 On peut prévoir les mutations figurant au tableau 2 ci-après.

30

35

Tableau 2

Exemples de mutations de résidus situés à l'interface $\alpha 1\beta 2$

5	Site	mutation	particularité de la mutation
10	$\beta 40$ (C6)	Arg $\rightarrow$ Asp	charge négative encombrement plus faible que Arg
		Arg $\rightarrow$ Val	hydrophobe fort encombrement stérique
		Arg $\rightarrow$ Ala	hydrophobe faible encombrement stérique
		Arg $\rightarrow$ Ser	groupement hydroxyle faible encombrement stérique
15		Arg $\rightarrow$ Lys	propriétés proches de celle de Arg
	$\beta 41$ (C7)	Phe $\rightarrow$ Tyr	groupement hydroxyle possibilité de liaison H
20	$\beta 101$ (G3)	Glu $\rightarrow$ Ala	hydrophobe faible encombrement stérique
	$\beta 102$ (G4)	Asn $\rightarrow$ Ala	hydrophobe faible encombrement stérique
		Asn $\rightarrow$ Gly	encombrement stérique nul

25

30

35

Parmi les chaînes polypeptidiques plus particulièrement intéressantes, il faut citer les chaînes mixtes alpha,bêta, c'est-à-dire notamment les chaînes constituées de l'extrémité N-terminale d'une chaîne de type bêta de la globine, et de l'extrémité C-terminale de la chaîne alpha de la globine ; ou, réciproquement, une chaîne constituée de l'extrémité N-terminale d'une chaîne alpha de la globine et de l'extrémité C-terminale d'une chaîne de type bêta de la globine.

Ces sous-unités chimériques seront notées, respectivement, $\text{NH}_2\text{bêta-alphaCOOH}$ ou $\text{NH}_2\text{alpha-bêtaCOOH}$.

La jonction alpha-bêta se situera de préférence au niveau de la zone flexible de la poche de l'hème, c'est-à-dire dans le segment EF.

Le polypeptide le plus intéressant comporte l'extrémité N-terminale de la chaîne bêta de la globine fusionnée jusqu'à l'acide aminé 73 compris à la partie C-terminale de la chaîne alpha de la globine à partir de l'acide aminé 69 compris.

Ce type de molécule chimérique associée sous forme tétramérique est représenté à la figure 8 sur laquelle on a visualisé les interfaces $\text{alpha}_1\text{bêta}_2$ reconstituées dans le tétramère.

Il est possible de prévoir que deux chaînes polypeptidiques soient reliées par une séquence, de préférence peptidique, située entre la séquence Z de l'une et la séquence V de l'autre, les deux chaînes sont ainsi solidaires, ce qui favorise la stabilité du tétramère.

Les deux chaînes peuvent également être reliées par réticulation ou par tout type d'interaction biochimique comme par exemple des liaisons de pontage covalent (dérivés de diaspirine ou de pyridoxal phosphate).

Le transporteur d'oxygène selon l'invention comportera une structure héminique ; il peut s'agir d'une molécule d'hème naturel ou bien d'une métalloporphyrine dans laquelle l'atome de fer est remplacé par un autre métal notamment le cobalt.

Dans le second mode de réalisation de l'invention, le tétramère est constitué essentiellement de quatre polypeptides identiques ayant chacun une structure de type bêta-globine. Ce type de tétramère dénommé β_4 sera, de préférence, constitué par des chaînes de type bêta
5 comportant l'une des mutations citées précédemment.

Il pourra, comme cela a été décrit, être préparé par association de dimères, ces dimères étant formés par liaison des extrémités N et C terminales de deux sous-unités.

Le transporteur d'oxygène selon l'invention présente en
10 général une affinité pour l'oxygène diminuée par rapport à l'hémoglobine naturelle, de préférence, cette affinité est diminuée d'au moins 20 % par rapport à celle de l'hémoglobine naturelle.

Le transporteur selon la présente invention est, de préférence, obtenu par culture d'un organisme transformé produisant ladite chaîne, il
15 peut s'agir de cellules eucaryotes comportant une séquence d'ADN codant pour ladite chaîne sous la dépendance d'éléments d'expression assurant l'expression de ladite séquence dans ladite cellule hôte.

La technologie des ADN recombinants permettant l'expression d'une séquence peptidique est maintenant largement connue et n'a pas à
20 être décrite en détail.

La cellule hôte est de préférence une cellule eucaryote et de préférence une levure et/ou une cellule eucaryote supérieure ou un animal transgénique. Quant au système d'expression, il peut s'agir soit de plasmides à répllication autonome, soit de plasmides permettant l'intégration
25 tion dans le génome de la cellule hôte. Les séquences codantes pouvant être sous la dépendance d'un promoteur hétérologue mais efficace dans l'hôte ou bien d'un promoteur homologue, ou bien encore d'un promoteur chromosomique. Il est possible également de prévoir des systèmes assurant, par exemple, la sécrétion de ces chaînes polypeptidiques.

30 Dans ce qui suit, on donnera des exemples de système d'expression des chaînes polypeptidiques selon la présente invention qui ne pourront, en aucun cas, être considérées comme des limitations.

L'obtention des tétramères est, la plupart du temps, spontanée, elle peut être favorisée suivant la structure exacte du tétramère

par des conditions particulières de mise en solution, notamment dans certaines conditions de pH et/ou de force ionique.

L'introduction d'un groupe héminique peut être spontanée, en particulier chez les eucaryotes, et les tétramères obtenus sont "héminisés" sans qu'il y ait lieu de prévoir une étape spécifique. La plupart du temps l'hème sera rajouté lors d'une étape ultérieure.

La présente invention concerne également des procédés permettant la préparation de ces chaînes polypeptidiques par des techniques mettant en oeuvre les ADN recombinants et l'éventuelle formation du tétramère, comme cela a été décrit précédemment (Hoffman et al, 1990 ; Nagai & Thogersen, 1984, 1987 ; Nagai et al, 1985 ; Tame et al, 1991 ; Wagenbach et al, 1991).

Enfin, la présente invention concerne l'utilisation des chaînes à titre de médicament, notamment pour le transport d'oxygène en combinaison avec un support acceptable dans le domaine transfusionnel.

Les exemples ci-après permettront de mieux mettre en évidence certaines caractéristiques et avantages de la présente invention.

Dans ce qui suit :

- la Figure 1 schématise la séquence nucléotidique et en amino-acides de la chaîne alpha,
- la Figure 2 schématise la séquence nucléotidique et en amino-acides de la chaîne bêta,
- la Figure 3 schématise la structure spatiale de la chaîne bêta, avec indication de la nomenclature des hélices,
- la Figure 4 représente le schéma du plasmide pATPrTet,
- la Figure 5 représente le schéma du plasmide pATPr cIIFX bêta,
- les Figures 6 et 7 schématisent la préparation du vecteur pATPr cIIFX bêta Gb,
- la Figure 8 représente le schéma de la structure spatiale d'un dimère selon l'invention, notamment la reconstitution de l'interface α_1 β_2 .
- la Figure 9 schématise les étapes de la construction du vecteur pATPr Chim bêta73-alpha69.

Afin de mieux comprendre la structure de l'hémoglobine, on pourra se reporter à des articles tels que celui de Max F. Perutz (1987) in Molecular Basis of Blood Diseases ainsi qu'à des ouvrages tels ceux de Dickerson & Geis (1983) et Fermi & Perutz (1981).

5 Sur la figure 1 on a représenté la structure en amino-acides de la chaîne alpha et sur la figure 2 la structure en amino-acides de la chaîne bêta.

La configuration spatiale de la chaîne bêta est représentée à la figure 3 avec la nomenclature des différents segments qui vont de l'extrémité NH₂ terminale vers l'extrémité COOH terminale :

10 NA, A, B, C, CD, D, E, EF, F, FG, G, GH, H et HC ;

quant à la chaîne alpha elle présente la structure :

NA, A, AB, B, C, CE, E, EF, F, FG, G, GH, H et HC.

Les segments A, B, C, E, F, G et H présentent une structure sensiblement hélicoïdale alors que les segments de jonction ne présentent pas une telle structure.

Les acides aminés sont numérotés soit à partir de l'extrémité N-terminale par ordre croissant, soit en affectant à un acide aminé la désignation de son hélice et son rang dans celle-ci.

20 Le 36ème acide aminé de la chaîne bêta est la Proline, il est bêta 36(C2) Pro, c'est-à-dire le deuxième acide aminé de l'hélice C.

PRODUCTION DE LA PROTEINE DE FUSION DANS E. COLI

25 Les manipulations portant sur l' ADN ont été effectuées en utilisant essentiellement les techniques classiques décrites par Sambrook et al dans le manuel "Molecular Cloning". Sauf indication contraire, les digestions par les enzymes de restriction ou de modification sont réalisées selon les indications des fabricants (Amersham, Boehringer Mannheim; New England Biolabs). L' ADNc codant pour la protéine de fusion cIIFX bêta

30 globine a été cloné par Nagai et al (1985) dans le phage M13 mp10. La construction M13 mp10 cIIFX bêta nous a été fournie sur demande au Medical Research Council (Cambridge, Grande-Bretagne).

EXEMPLE 1 : Construction du vecteur d'expression p AT Pr CIIFX bêta Gb

Le vecteur de base pAT Pr Tet présente une origine de
réplication dérivée de pBR 322 et porte le gène de résistance à la
5 tétracycline. Il permet l'expression de protéines hétérologues sous le
contrôle du promoteur Pr du phage lambda. L'activité de ce promoteur est
réprimée par le répresseur CI (allèle CI₈₅₇, thermosensible). Le promoteur
Pr est bloqué à 30° C. L'élévation de la température à 42° C inactive le
répresseur et induit la transcription à partir du promoteur Pr (figure 4).

Préparation de l' ADN plasmidique

Les bactéries E. coli CAG 1139 portant le plasmide sont mises
en culture à 37° C (1 L milieu LB) jusqu'à obtention d'une DO à 600 nm
15 d'environ 0,4. On ajoute du chloramphénicol à une concentration finale de
170 µg/ml, et on continue l'incubation à 37° C pendant 12-16 heures. Les
bactéries sont lysées par traitement avec une solution de NaOH-SDS, et
l'ADN plasmidique est purifié à partir du culot bactérien par précipitation
avec le polyéthylène glycol. Le protocole utilisé est très exactement celui
20 décrit par Sambrook et al (1989).

10 µg d' ADN plasmidique pAT Pr Tet ainsi purifié sont
incubés en présence de 5 unités d'endonucléase de restriction BamHI, 10
minutes à 37° C (digestion ménagée). La forme linéaire du plasmide est
séparée sur gel d'agarose 0,8 %, et recueillie par électroélution. L'ADN est
25 précipité par l'éthanol après extraction au phénol/chloroforme. Le précipité
est repris dans 90 µl d'eau distillée et traité par la nucléase de haricot
mung (mung bean nuclease, New England Biolabs) de façon à obtenir le
codon d'initiation ATG sous forme d'extrémité franche. Après extraction au
phénol/chloroforme et précipitation par l'éthanol, l' ADN est dissout dans
30 90 µl d'eau et incubé en présence de 100 unités d'endonucléase de
restriction XhoI (figure 6). Le fragment BamHI/Xho de 4500 bp est séparé
par électrophorèse sur gel d'agarose, recueilli par électroélution, et
précipité par l'éthanol après extraction au phénol/chloroforme.

Préparation de la séquence à insérer

La séquence codant pour la protéine de fusion a été obtenue par la technique de PCR à partir de la forme répliquative double brin du phage M13 mp10 (10 ng). La forme répliquative double brin est préparée
5 selon la technique indiquée ci-dessus pour l'ADN plasmidique, à partir d'un culot bactérien *E. coli*, souche JM 101. Un site reconnu par l'endonucléase de restriction SnaBI est introduit à l'extrémité 5' de la séquence codante. La coupure par cette enzyme génère une extrémité franche correspondant
10 au premier nucléotide du premier codon de la protéine de fusion. Un site reconnu par l'endonucléase de restriction XhoI est créé à l'extrémité 3', immédiatement après le codon stop (Fig. 7). Le produit de PCR est précipité par l'éthanol après extraction au phénol/chloroforme. Le précipité est repris par 90 µl de tampon Tris-HCl 10 mM/ EDTA 1mM. L'ADN est
15 traité par les endonucléases de restriction SnaBI (15 unités, 2 heures, 37° C) puis XhoI (25 unités, 2 heures, 37° C). Il est précipité par l'éthanol après extraction au phénol/chloroforme. Le précipité est repris dans 10 µl de tampon Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM. L'insertion dans le vecteur d'expression est réalisée en utilisant un rapport vecteur/insert de 1/5 (soit
20 3 µl de la solution d'ADN vecteur et 3 µl de la solution d'insert). Le mélange est incubé en présence de T4 ADN ligase, 4 heures à température ambiante.

Le mélange réactionnel est utilisé pour transformer des bactéries CAG 1139 compétentes (traitement CaCl_2). Les bactéries
25 transformées sélectionnées par la résistance à la tétracycline sont testées pour l'expression de la protéine de fusion.

Le vecteur ainsi obtenu pAT Pr cIIFX bêta dirige la synthèse d'une protéine de fusion cIIFX bêta globine contenant :

- les 31 résidus N-terminaux de la protéine CII du phage lambda ;
- 30 - le térapeptide Ile-Glu-Gly-Arg, séquence reconnue par le facteur de coagulation X activé, ce qui permet de libérer la sous-unité bêta globine après purification de la protéine de fusion ;
- la bêta globine.

EXEMPLE 2 : Expression de la protéine dans Escherichia coli

La souche E. coli CAG 1139 portant le plasmide pAT Pr cIIFX bêta est incubée à 30° C dans du milieu M9 (Na_2HPO_4 50 mM/ KH_2PO_4 20 mM/ NaCl 8,5 mM/ NH_4Cl 20 mM/ MgSO_4 0,1 mM) contenant 2 g de glucose, 20g d'extrait de levure et 0.5 g de vitamine B1 par litre) en présence de tétracycline (10 mg par litre). Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,8-1,2, on élève rapidement la température à 42° C, et l'on continue l'incubation pendant 3-4 heures. Le culot bactérien est congelé à -80° C.

EXEMPLE 3 : Extraction et purification de la protéine de fusion

Le culot bactérien (100 g poids humide) est décongelé et mis en suspension dans 100 ml Tris-HCl 50 mM, pH 8/ saccharose 25 % (p/v)/EDTA 1 mM. Les bactéries sont lysées par incubation en présence de 200 mg de lysozyme (30 minutes dans la glace). On ajoute du MgCl_2 , du MnCl_2 et de la DNase I de façon à obtenir des concentrations finales respectives de 10 mM, 1 mM et 10 µg/ml. Après 30 min d'incubation à température ambiante, on ajoute au lysat 200 ml de NaCl 0,2M/ acide désoxycholique 1 % (p/v)/Nonidet P-40 1,6 % (v/v)/Tris-HCl 20 mM, pH 7,5/EDTA 2 mM. Le précipité est recueilli par centrifugation à 5000 g, 10 min, remis en suspension dans du Triton X-100 1 % (v/v)/EDTA 1 mM et centrifugé à nouveau. Les lavages dans la solution de Triton X-100 sont renouvelés jusqu'à obtention d'un précipité compact.

Le précipité de protéine est dissout dans une solution de guanidine-HCl 6M/Tris-AcOH 25 mM, pH 5,0/EDTA 1 mM/dithiothreitol 1 mM. La solution est équilibrée dans un tampon urée 8M/Tris-AcOH 25 mM, pH 5,0/EDTA 1 mM/dithiothreitol 1 mM par filtration sur une colonne de Sephadex G-25, puis déposée sur une colonne de CM-Sepharose (4 x 10 cm) équilibrée avec le même tampon. La protéine de fusion est éluée à l'aide d'un gradient linéaire formé par 500 ml d'urée 8M/Tris-AcOH 25 mM,

pH 5,0/EDTA 1mM/dithiothreitol 1 mM et 500 ml du même tampon additionné de NaCl qsp une concentration de 0,2 M. La protéine de fusion est ensuite purifiée par filtration sur colonne de Sephacryl S-200 (5 x 60 cm) en milieu guanidine-HCl 5 M/Tris-HCl 50 mM, pH 8,0/EDTA 1 mM/dithiothreitol 1 mM. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées, dialysées contre de l'eau et lyophilisées, ou dialysées contre le tampon de clivage pour être traitées immédiatement par le facteur X activé.

Après purification de la protéine de fusion et hydrolyse tryptique, la présence de la mutation et le profil peptidique sont vérifiés par chromatographie liquide haute performance (Baudin-Chich et al, 1987).

EXEMPLE 4 : Clivage de la protéine de fusion par le facteur Xa

La protéine lyophilisée est dissoute dans une solution d'urée 8M/Tris-HCl 50 mM, pH 8,0/EDTA 1 mM/dithiothreitol 1 mM, puis dialysée contre le tampon de clivage : urée 0,5M/Tris-HCl 50mM, pH 8,0/CaCl₂ 1 mM. La protéine de fusion est incubée à 0° C en présence de facteur X activé par le venin de vipère de Russel immobilisé sur Sepharose 6B activé au bromure de cyanogène (rapport enzyme/substrat 1,5 % p/p). La qualité du clivage est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Après dialyse contre de l'eau, la protéine est lyophilisée.

EXEMPLE 5 : Construction du mutant bêtaH2M

La mutation est introduite dans l'ADN en utilisant un oligonucléotide initiateur synthétique de séquence dC AGG AGT CAG CAT CAC CCT ACC C. Cette séquence est complémentaire à celle de l'ADNc codant pour la sous-unité bêta de globine encadrant le codon de l'histidine bêta (NA2). Le triplet introduit CAT (au lieu de GTG) est altéré de telle sorte à coder pour une méthionine. La mutagénèse est réalisée en utilisant

la réplication du phage M13 dans lequel est inséré l'ADNc codant pour la chaîne bêta de globine (Nagai & Thogersen, 1984), par la méthode de Nakamaye & Eckstein (1986) préconisée par Amersham (Kit Amersham). Le produit de la réaction de mutagénèse est utilisé pour transformer des bactéries compétentes E. coli, souche JM 101 selon les méthodes classiques (Nagai & Thogersen, 1987 ; Sambrook et al, 1989). Les phages portant la mutation sont détectés par séquençage de l'ADN (méthode de Sanger, 1977). La séquence complète de l'ADNc codant pour la protéine de fusion est vérifiée de façon à s'assurer de l'intégrité de la séquence codante.

La séquence codante contenant la mutation est traitée comme décrit ci-dessus pour être insérée dans le vecteur d'expression.

EXEMPLE 6 : Construction du mutant bêtaH2I

La mutation est introduite dans l'ADNc en utilisant l'oligonucléotide initiateur dAGG AGT CAG GAT CAC CCT ACC C. Le triplet GAT (pour GTG) permet de coder pour une isoleucine.

EXEMPLE 7 : Construction du mutant bêtaF41Y

La mutation est introduite dans l'ADNc en utilisant l'oligonucléotide initiateur dGGA CTC AAA GTA CCT CTG GGT. Le triplet GTA (pour GAA) permet de coder pour une tyrosine.

EXEMPLE 8 : Construction du vecteur pAT Pr Chim bêta73-alpha69

La construction codant pour la chimère bêta-alpha globine est construite par PCR à partir de deux plasmides :

- le plasmide pAT Pr bêta, portant le gène bêta globine (exemple 1),
- un plasmide portant l'ADNc alpha globine : alpha1.

On utilise les amorces suivantes :

Nsi : 5' GCA TTT AAT GCA TTG ATG CC 3'
 Ch : 5' TTT CTC GAG TTA ACG GTA TTT GGA 3'
 D : 5' GTG CCT TTA GTG ATG CCG TGG CGC ACG TGG
 ACG ACA TGC C 3'
 5 D inv : 5' TCC ACG TGC GCC ACG GCA TCA CTA AAG GCA
 C 3'

Le fragment codant pour CIIFX NH₂(1-73)bêta est amplifié à partir du vecteur pAT Pr bêta en utilisant les amorces Nsi et Dinv. Les conditions sont les suivantes :

10

Tampon PCR	5 µl
Mix	12 µl
Amorce Nsi	5 µl (à 10 µM)
Amorce Dinv	5 µl (à 10 µM)
15 Plasmide pAT Pr bêta	10 ng (1 µl)
Taq polymérase (Cetus)	1 µl
H ₂ O	qsp 50 µl

On réalise 27 cycles :

20

97° C : 30 sec
 58° C : 1 mn
 70° C : 2 mn = (2 sec/cycle)

25

Le produit de PCR est précipité par l'éthanol après extraction au phénol/chloroforme. Le fragment correspondant à la taille recherchée est recueilli par électroélution après électrophorèse sur gel d'agarose.

Le fragment codant pour alpha(69-141)COOH de l'alpha globine est amplifié à partir du plasmide alphaIpJW101 (Wilson et al, 1978)
 30 en utilisant les amorces D et Ch. Les conditions sont les suivantes :

35

22

	Tampon PCR	5 μ l
	Mix	12 μ l
	Amorce D	5 μ l (à 10 μ M)
	Amorce Chim6	5 μ l (à 10 μ M)
5	Plasmide alphaI	1 μ l (= 10 ng)
	Taq polymérase (Cetus)	1 μ l
	H ₂ O	qsp 50 μ l

10 On réalise 27 cycles de la même manière que pour la première amplification.

Il est purifié comme précédemment.

Une troisième amplification est effectuée à partir des deux fragments purifiés en utilisant les amorces Nsi et Ch. Les conditions sont les suivantes :

15	Tampon PCR	5 μ l
	Mix	12 μ l
	Amorce Chim6	5 μ l (à 10 μ M)
	Amorce Nsi	5 μ l (à 10 μ M)
20	ADN obtenu par la première PCR	1 μ l (environ 50 ng)
	ADN obtenu par la deuxième PCR	3 μ l (environ 50 ng)
	Taq polymérase (Cetus)	1 μ l
25	H ₂ O	qsp 50 μ l

On effectue 35 cycles :

	97° C : 30 sec
30	55° C : 1 mn
	70° C : 2 mn + (2 sec/cycle)

35

Le produit de PCR est précipité par l'éthanol après extraction au phénol/chloroforme, puis purifié. Il est inséré dans le plasmide pAT Pr Tet aux sites NsiI et XhoI. Ce vecteur permet d'exprimer une protéine de fusion comprenant :

- 5 - les 31 acides aminés N-terminaux de la protéine CII du phage lambda,
- la séquence Ile-Glu-Gly-Arg reconnue par le facteur Xa,
- une sous-unité chimérique de 146 acides aminés, constituée par les résidus N terminaux 1 à 73 inclus de la chaîne bêta de globine et les résidus C terminaux 69 à 141 de la chaîne alpha (chimère $\text{NH}_2(1-73)\beta\text{-alpha}(69-141)\text{COOH}$). La figure 9 schématise les étapes de la construction.

10 Ce plasmide est exprimé chez E. coli, souche CAG 1139 (Grossman et al, 1983, Cell, 32, 151-159). Cette souche de phénotype : F⁻ thi leu thr LacY TonA SupE galK Lon 100 est transformée par la méthode conventionnelle de traitement au CaCl_2 .

- 15 La culture est effectuée en milieu LB en présence de tétracycline 50 µg/ml à 30° C ; quand la DO atteint 0,8-1,2, l'expression de la protéine d'ADN est induite par passage à 42° C. Après 2 heures, il est possible de mettre en évidence la synthèse de la chaîne (bêta-alpha) sur gel de SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie par comparaison avec un
- 20 échantillon de culture de CAG 1139 non transformée. On estime que la quantité en chaîne bêta-alpha atteint 20 % des protéines totales. La construction a été séquencée pour vérifier qu'il n'y avait pas de mutation lors des PCR successifs.

25 EXEMPLE 9: Caractérisation fonctionnelle des hémoglobines recombinantes

Mesures dans les conditions d'équilibre:

- 30 Après purification des solutions d'Hb, les spectres d'absorbance sont enregistrés et comparés au spectre de l'Hb A native oxygénée (spectrophotomètre Cary 219, Varian, Palo Alto, Ca, USA). Ces spectres permettent de tester la présence de méthémoglobine ou d'hémichrome (Szebeni et al, 1984).

Les mesures de l'affinité pour l'oxygène à l'équilibre sont effectuées à l'aide d'un système automatique commercial (Hemox analyzer, TCS, Southampton PA, USA) (Asakura, 1979) associant la mesure simultanée de l'absorbance à deux longueurs d'onde par spectrophotométrie et celle de la pression partielle de l'oxygène par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (YSI 5331). Dans les conditions habituelles les courbes de désoxygénation sont enregistrées dans des solutions d'Hb (60 à 100 μM en hème) dans un tampon 50 mM bisTris, 100 mM NaCl, pH 7,2 à 25°C, 50 μM d'EDTA et 20 $\mu\text{g/ml}$ de catalase sont ajoutés au tampon pour limiter l'oxydation de l'hémoglobine. La concentration de NaCl, le pH peuvent être modifiés pour tester les différentes propriétés de l'Hb recombinante (effet Bohr, effecteurs anioniques). D'autres effecteurs naturels (2,3 diphosphoglycérate) ou non naturels (IHP, dérivés du clofibrate) peuvent être ajoutés à la solution au début de l'enregistrement. Typiquement la solution est d'abord équilibrée sous un mélange gazeux dont la pression partielle en oxygène est d'au moins 350-450 mmHg pour assurer une saturation initiale quasi-complète de l'hémoglobine. La solution est alors désoxygénée lentement en admettant de l'azote pur dans la cuvette de mesure. La durée de l'enregistrement est de 45 à 60 min pour assurer les conditions d'équilibre. Ces conditions d'équilibre sont démontrées par la superposition des courbes de désoxygénation et de ré-oxygénation. La concentration d'Hb est mesurée après transformation en cyanmethémoglobine ($\epsilon_{540} = 11 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La quantité de méthémoglobine (Hb oxydée) formée pendant l'enregistrement est mesurée par spectrophotométrie selon la méthode de Benesh et al (1973).

200 à 300 couples de valeurs (Abs/ PO_2) sont en général enregistrés et stockés sur bande magnétique à l'aide d'un ordinateur. Les valeurs de P_{50} (pO_2 de demi-saturation et index de l'affinité pour l'oxygène) et n_{50} (index de la coopérativité) sont calculés à partir des mesures enregistrées entre 40 et 60 % de saturation par régression linéaire selon l'équation empirique de Hill ; l'ensemble des données des courbes d'équilibre sont ajustées à l'équation du modèle allostérique à deux états quaternaires (Monod et al, 1965) à l'aide de l'algorithme de régression

itérative non-linéaire par moindres carrés (Bevington, 1969) comme décrit en détail dans Kister. et al, (1987).

La vitesse d'auto-oxydation de l'hémoglobine est mesurée par spectrophotométrie de la solution (100 μ M hème) incubée dans un tampon
5 100 mM Phosphate à 37° C en fonction du temps (0 $\longrightarrow$ 24 h). La stabilité thermique est mesurée par incubation des solutions (300 μ M hème) à 65° C en fonction du temps (0 $\longrightarrow$ 120 min).

10 Mesures cinétiques

Les mesures cinétiques sont effectuées dans les solutions d'Hb recombinantes équilibrées sous 1 ou 0,1 atm de monoxyde de carbone (CO). Dans ces études on mesure spécifiquement la vitesse de recombinaison du
15 CO à l'hémoglobine après sa photodissociation par un éclair de lumière laser (Marden et al, 1988).

Les études de photodissociation sont pratiquées à l'aide d'un système laser 10-ns (Quantel YG 585) délivrant 160 mJ à 532 nm. L'énergie du faisceau de photodissociation peut être modifiée pour étudier les conditions de photolyse partielle.

20 Les échantillons sont étudiés dans des cuvettes de 1 ou 2 mm de trajet optique. Le faisceau de détection à 436 nm est quasi colinéaire avec le faisceau de photodissociation. L'intensité de lumière transmise est détectée par un photomultiplicateur (IP28 Hamamatsu, Japon) et enregistrée sur un oscilloscope digital (Lécroy 9400). Les données sont
25 ensuite transférées dans un microcalculateur IBM pour les calculs des changements d'absorbance et l'analyse des données. Les simulations cinétiques sont basées sur le modèle allostérique à deux états. Typiquement la courbe enregistrée pour l'Hb A native montre l'existence de deux vitesses de recombinaison du CO à l'hémoglobine: l'une est rapide et
30 correspond à la recombinaison à l'état R de forte affinité pour le ligand ; la deuxième est plus lente et correspond à la recombinaison à l'état T de faible affinité. Les expériences de cinétiques permettent de tester très rapidement la fonctionnalité des Hb recombinantes avec le minimum d'échantillon.

En présence d'hémine, les sous-unités chimériques obtenues selon les exemples s'assemblent en tétramère qui fixe l'oxygène de façon réversible pratiquement sans coopérativité mais avec une affinité légèrement inférieure à celle observée pour l'Hb A native et trente fois
5 inférieure à celle du tétramère β ⁴.

10

15

20

25

30

35

REFERENCES

- Ahern *et al*, FEBS Lett 1976, 69, 99-102.
 Arous *et al*, FEBS Lett 1981, 126, 114-116.
 Asakura, Critical Care Medicine 1979, 7, 391-395
 Baudin-Chich *et al*, Acta Haematol. 1987, 78, 127-129.
 Bihoreau *et al*, Protein Science, sous presse.
 Baglioni, Biochim. Biophys. Acta 1962, 59, 437-449.
 5 Baklouti *et al*, Blood 1986, 67, 957-961.
 Benesch *et al*, Anal. Biochem. 1973, 55, 245-248.
 Beretta *et al*, Nature 1968, 217, 1016-1018.
 Bernini & Giordano, Biochim. Biophys. Acta 1988, 957, 281-285.
 Blouquit *et al*, FEBS Lett. 1984, 172, 155-158.
 Bevington, in *Data reduction and error analyses*, 1969.
 Bonaventura & Riggs, J. Biol. Chem 1968, 243, 980-991.
 10 Bonaventura *et al*, J. Biol. Chem 1976, 251, 7563-7571.
 Bratu *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1971, 251, 1-6.
 Charache *et al*, J. Clin. Invest. 1973, 52, 2858-2864.
 Dacie *et al*, Nature 1967, 216, 663-665.
 Dickerson & Geis. "Hemoglobin : Structure, Function, Evolution, and Pathology"
 1983, The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc. California.
 Fessas *et al*, Br. J. Haematol. 1982, 51, 577.
 15 Fermi & Perutz. "Atlas of Molecular Structures in Biology. Haemoglobin and Myoglobin"
 1981, D.C. Phillips and F.M. Richards Eds, Clarendon Press, Oxford.
 Gacon *et al*, FEBS Lett. 1977, 82, 243-246.
 Garel *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1976, 420, 97-104.
 Harano *et al*, Hemoglobin 1990, 14, 217-222.
 Hoffman *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 8521-8525.
 Huang *et al*, Biochem. 1990, 29, 7020-7023.
 Idelson *et al*, Nature 1974, 249, 768-770.
 20 Imamura *et al*, J. Clin. Invest 1969, 48, 2341-2348.
 Jones *et al*, J. Mol. Evol. 1976, 9, 37-44.
 Keeling *et al*, J. Clin. Invest. 1971, 50, 2395-2442.
 King *et al*, Br. J. Haematol. 1972, 22, 125-134.
 Kister, J. *et al*, J. Biol. Chem. 1987, 262, 12085-12091.
 Knuth *et al*, Acta Haematol 1979, 61, 121-124.
 Konotey-Ahulu *et al*, J. Med. Genet. 1968, 5, 107-111.
 25 Kurachi *et al*, Nature New Biol. 1973, 243, 275-276.
 Lin *et al*, Biochem. 1990, 29, 5562-5566
 Marden *et al*, Biochemistry 1988, 27, 1659-1664).
 Marinucci *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1981, 668, 209-215.
 Mérauli *et al*, FEBS Lett 1985, 184, 10-13.
 Mérauli *et al*, Hemoglobin 1986, 10, 593-605.
 Minnich *et al*, Blood 1965, 25, 830-838.
 30 Miyaji *et al*, Clin. Chim. Acta 1966, 14, 624-629.
 Monod J. *et al*, J. Mol. Biol. 1965, 12, 88-118)
 Moo-Penn *et al*, J. Biol. Chem. 1976, 251, 7557-7562.
 Moo-Penn *et al*, Biochem. 1977, 16, 4872-4879.
 Moo-Penn *et al*, FEBS Lett 1978, 92, 53-56.
 Moo-Penn *et al*, Am. J. Hematol. 1981, 11, 137-145.
 Nagai & Thogersen, Nature 1984, 309, 810-812.
 Nagai & Thogersen, Meth. Enzymol. 1987, 153, 461-481.
 35 Nagai *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 7252-7255.
 Nagai *et al*, Nature 1987, 329, 858-860.
 Nagai *et al*, BioEssays 1988, 8, 79-82.

- Nagel *et al*, N. Engl.J. Med.1976, 295, 125-130.
Nakamaye & Eckstein, Nucleic Ac. Res. 1986, 14, 9679-9698.
Ogata *et al*, Hemoglobin 1986, 10, 469-481.
5 Ohba *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1975a, 405, 155-160.
Ohba *et al*, Acta Haematol. Jap. 1975b, 38, 53-58.
Ohba *et al*, Hemoglobin 1986, 10, 109-125.
Pagnier *et al*, Br. J. Haematol. 1990, 74, 531-534.
Ranney *et al*, Nature 1967, 213, 876-878.
Sambrook *et al*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press,
New-York, 2ond edition, 1989.
10 Sanger *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, 74, 5463-5467.
Schneider *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1975a, 400, 365-373.
Schneider *et al*, Biochem Genet.1975b, 13, 411-415.
Shih *et al*, Hemoglobin 1987, 11, 453-464.
Steadman *et al*, Brit. J. Haematol.1970, 18, 435-446.
Szebeni *et al*, Biochem. J. 1984, 220, 695-692.
Tame *et al*, J. Mol. Biol. 1991, 218, 761-767.
Tatsis *et al*, Blood 1976, 47, 827-832.
15 Turner *et al*, Biochem Genet 1976, 14, 577-585.
Wagenbach *et al*, Biotechnology 1991, 9, 57-61.
Wajcman *et al*, FEBS Lett 1972, 27, 298-300.
Wajcman & Jones, INSERM 1977, 70, 269-276.
Wajcman *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1991, 1096, 60-66.
Williamson *et al*, Hemoglobin 1987, 11, 221-230.
Williamson *et al*, Hemoglobin 1990, 14, 137-145.
20 Wilson *et al*, Nucleic Ac. Res.1978, 5, 563-581.
Yeager *et al*, Pediatr. Res.1983, 17, 503-507.

25

30

35

REVENDICATIONS

1) Transporteur d'oxygène du type comportant quatre chaînes polypeptidiques de type globine, pratiquement identiques, susceptibles de s'associer ou d'être associées entre elles afin d'assurer une activité de fixation réversible de l'oxygène.

2) Transporteur d'oxygène artificiel selon la revendication 1, comportant quatre chaînes polypeptidiques pratiquement identiques incorporant l'hème et ayant chacune une structure de type globine séquencée :

V - (W) - X - (Y) - Z

dans laquelle :

- V, X, et Z sont des séquences polypeptidiques de type globine, et
- (W) et (Y) sont deux séquences polypeptidiques complémentaires susceptibles d'interagir pour constituer une interface qui, lorsqu'elle appartient à deux chaînes distinctes, est au moins en partie similaire à l'interface $\alpha_1 \beta_2$, lesdites chaînes pouvant s'associer en reconstituant ladite interface similaire à l'interface $\alpha_1 \beta_2$ afin d'assurer une activité de fixation réversible de l'oxygène.

3) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la séquence polypeptidique de type globine correspondant à X comporte un ou plusieurs segments hélicoïdaux choisis parmi les segments hélicoïdaux D, E et F des chaînes de type alpha ou bêta, lesdits segments pouvant être reliés entre eux par des segments non hélicoïdaux ou par des liaisons simples.

4) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence polypeptidique de type globine correspondant à Z comporte un ou plusieurs segments hélicoïdaux choisis parmi les segments hélicoïdaux G et H des chaînes de type alpha ou bêta, lesdits segments pouvant être reliés entre eux par des segments non hélicoïdaux ou par des liaisons simples.

5) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence polypeptidique de type globine correspondant à V comporte au moins un ou plusieurs segments hélicoïdaux choisis parmi les segments A, B et C des chaînes de type alpha ou bêta, lesdits segments pouvant être reliés entre eux par des segments non hélicoïdaux ou par des liaisons simples.

6) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que chaque chaîne est constituée de l'extrémité N-terminale d'une chaîne de type bêta de la globine comportant le segment CD, et de l'extrémité C-terminale de la chaîne de type alpha de la globine comportant le segment FG.

7) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que chaque chaîne est constituée de l'extrémité N-terminale d'une chaîne de type alpha de la globine et de l'extrémité C-terminale d'une chaîne de type bêta de la globine.

8) Transporteur d'oxygène selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'extrémité N-terminale de la chaîne bêta de la globine est fusionnée jusqu'à l'acide-amino 73 compris à la partie C-terminal de la chaîne alpha de la globine à partir de l'acide-amino 69 compris.

9) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que deux chaînes polypeptidiques sont reliées, notamment par une séquence peptidique, entre la séquence Z de l'une et V de l'autre.

10) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les quatre chaînes polypeptidiques sont des chaînes de type bêta globine.

11) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comporte des séquences provenant de globine de type alpha ou bêta humaine ayant subi au moins une mutation.

12) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'hème comporte une substitution de l'atome de fer par un autre métal.

13) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il présente une affinité pour l'oxygène diminuée par rapport à l'hémoglobine naturelle.

14) Transporteur d'oxygène selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il présente une affinité pour l'oxygène diminuée d'au moins 20 % par rapport à l'hémoglobine naturelle.

5 15) Transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la chaîne peptidique est obtenue par culture d'un organisme transformé produisant ladite chaîne.

10 16) Transporteur d'oxygène selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'organisme transformé est une cellule eucaryote comportant une séquence d'ADN codant pour ladite chaîne sous la dépendance d'éléments d'expression assurant l'expression de ladite séquence dans ladite cellule hôte.

15 17) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient un transporteur d'oxygène selon l'une des revendications 1 à 14, dans un véhicule acceptable physiologiquement.

20

25

30

35

1/9

Séquence alpha globine : cDNA/ Acides aminés

1	GTG	CTG	TCT	CCT	GCC	GAC	AAG	ACC	AAC	GTC	AAG	GCC	TGG	GGC	45
	Val	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Trp	Gly	
46	AAG	GTT	GGC	GGG	CAC	GCT	GGC	GAG	TAT	GGT	GGG	GAG	CTG	GAG	90
	Lys	Val	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Leu	Glu	
91	AGG	ATG	TTC	CTG	TCC	TTC	CCC	ACC	ACC	AAG	ACC	TAC	TTC	CCG	135
	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	
136	TTC	GAC	CTG	AGC	CAC	GGC	TCT	GGC	CAG	GTT	AAG	GGC	CAC	GGC	180
	Phe	Asp	Leu	Ser	His	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	
181	AAG	GTG	GCC	GAC	GGG	CTG	ACC	AAC	GGC	GTG	GGG	CAC	GTG	GAC	225
	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val	His	Val	Asp	
226	ATG	CCC	AAC	GGG	CTG	TCC	GGC	CTG	AGC	GAC	CTG	CAC	GGG	CAC	270
	Met	Pro	Asn	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	His	Ala	Lys	
271	CTT	CGG	GTG	GAC	CCG	GTC	AAC	TTC	AAG	CTC	CTA	AGC	CAC	TGC	315
	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	
316	CTG	GTG	ACC	CTG	GCC	GCC	CAC	CTC	CCC	GCC	GAG	TTC	ACC	CCT	360
	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	
361	GTG	CAC	GCC	TCC	CTG	GAC	AAG	TTC	CTG	GCT	TCT	GTG	AGC	ACC	405
	Val	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	
406	CTG	ACC	TCC	AAA	TAC	CGT									
	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg									

Figure 1

2/9

Séquence bêta globine : cDNA/ Acides aminés

1	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT	GCC	CTG	TGG	45
	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	
46	GCC	AAG	GTG	AAC	GTG	GAT	GAA	GTT	GGT	GAG	GCC	GCC	CTG	GCC	AGG	90
	Gly	Lys	Val	Asn	Val	Asp	Glu	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	
91	CTG	CTG	GTT	GTC	TAC	CCT	TGG	AOC	CAG	AGG	TTC	TTT	GAG	TCC	TTT	135
	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	
136	GGG	GAT	CTG	TCC	ACT	CCT	GAT	GCT	GTT	ATG	GGC	AAC	CCT	AAG	GTG	180
	Gly	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	
181	AAG	GCT	CAT	GGC	AAG	AAA	GTG	CTC	GGT	GCC	TTT	AGT	GAT	GCC	CTG	225
	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	
226	GCT	CAC	CTG	GAC	AAC	CTC	AAG	GGC	AOC	TTT	GCC	ACA	CTG	AGT	GAG	270
	Ala	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	
271	CTG	CAC	TGT	GAC	AAG	CTG	CAC	GTG	GAT	CCT	GAG	AAC	TTC	AGG	CTC	315
	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Phe	Arg	Leu	
316	CTG	GCC	AAC	GTG	CTG	GTC	TGT	GTG	CTG	GCC	CAT	CAC	TTT	GCC	AAA	360
	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Cys	Val	Leu	Ala	His	His	Phe	Gly	Lys	
361	GAA	TTC	ACC	CCA	GTG	CAG	GCT	GCC	TAT	CAG	AAA	GTG	GTG	GCT	GCT	405
	Glu	Phe	Thr	Pro	Pro	Val	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	
406	GGT	GTG	GCT	AAT	GCC	CTA	GCC	CAC	AAG	TAT	CAC					
	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His					

Figure 2

3/9

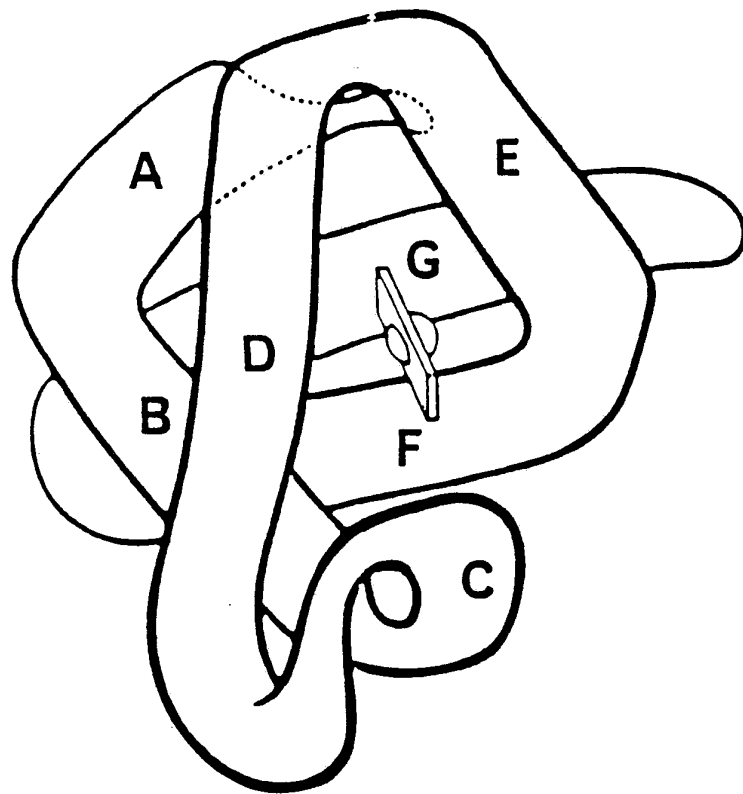


Figure 3

4/9

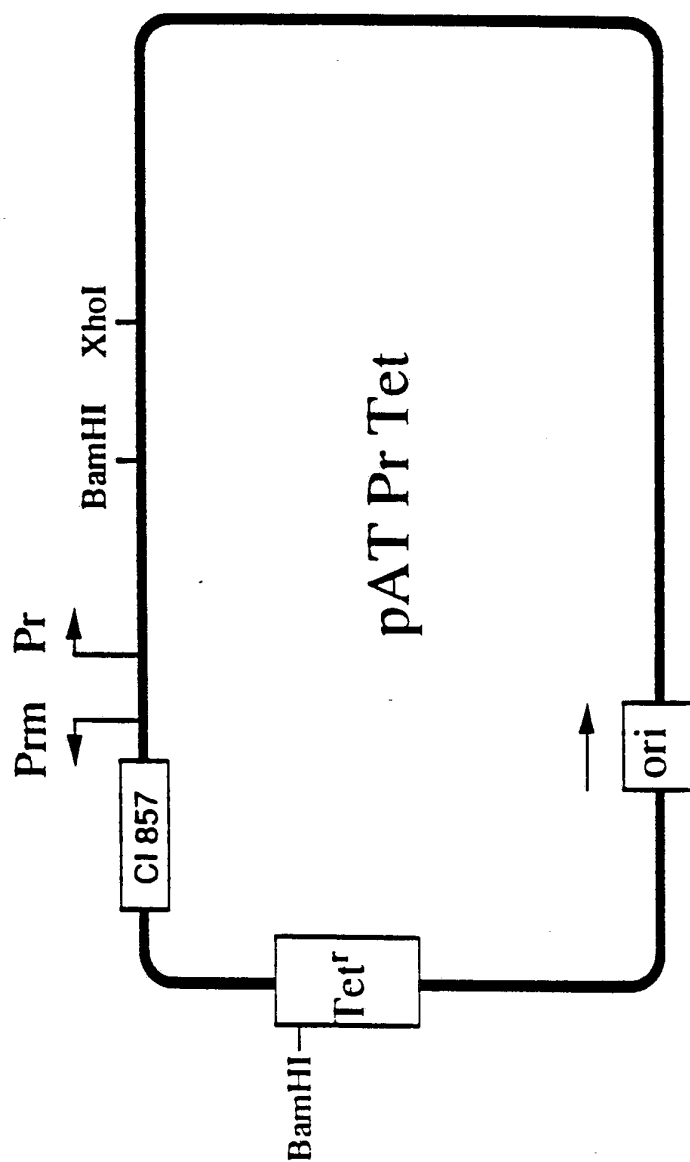


Figure 4

5/9

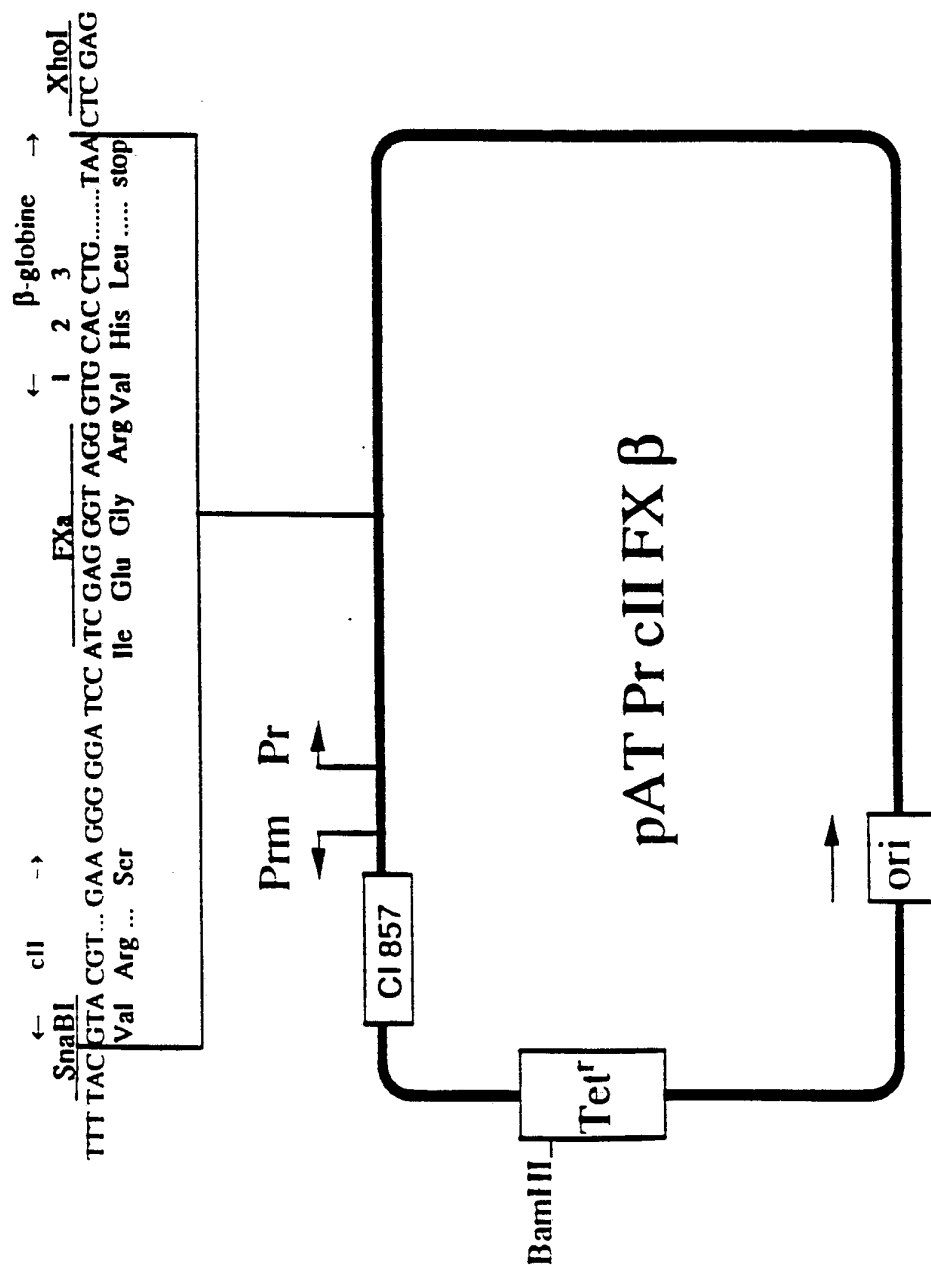


Figure 5

6/9

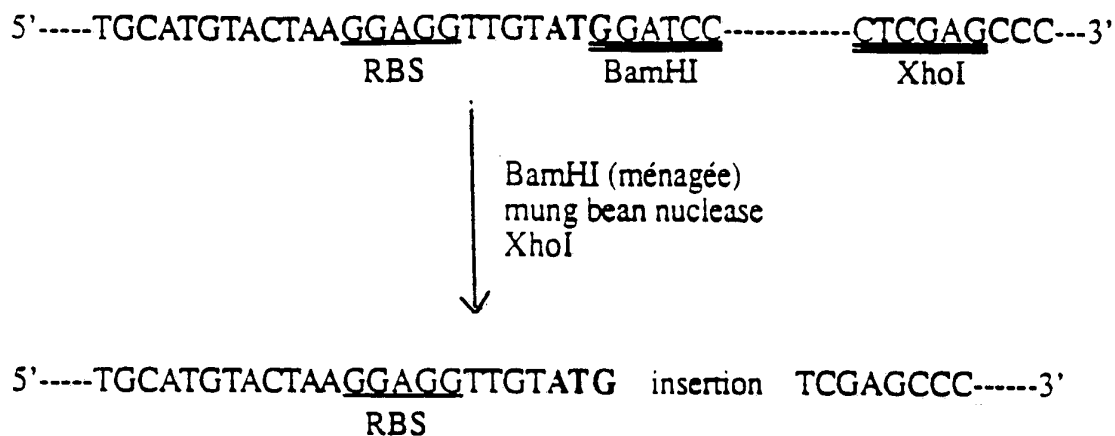


Figure 6

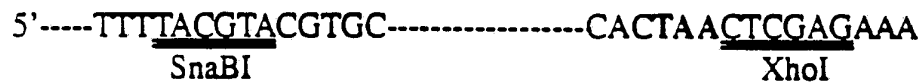


Figure 7

7/9

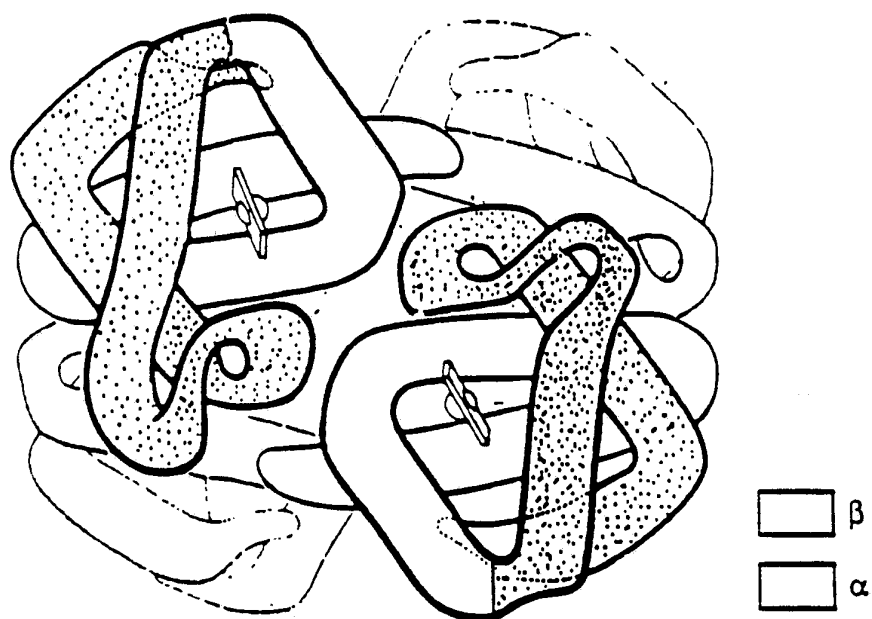


Figure 8

8/9

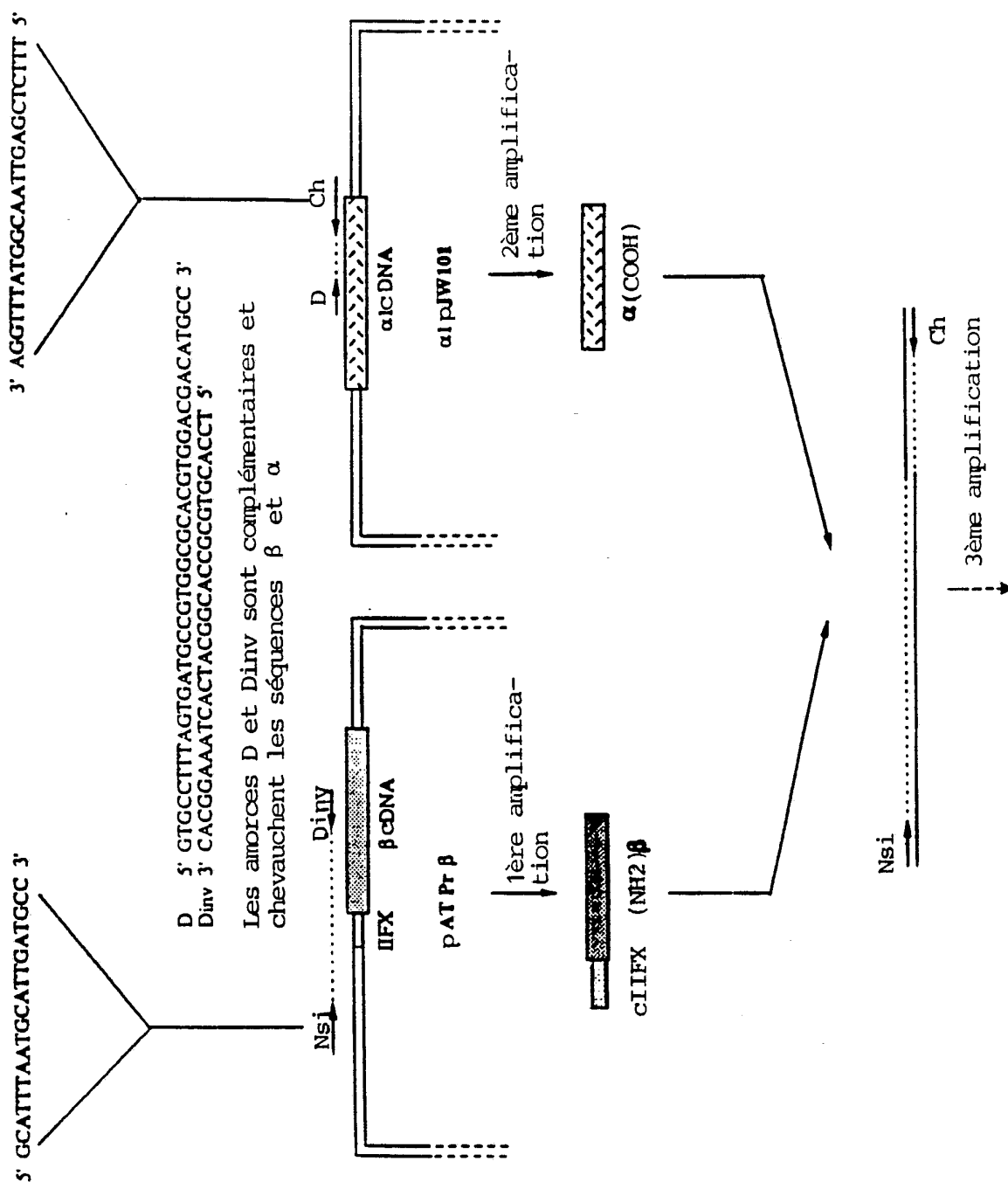


Figure 9

9/9

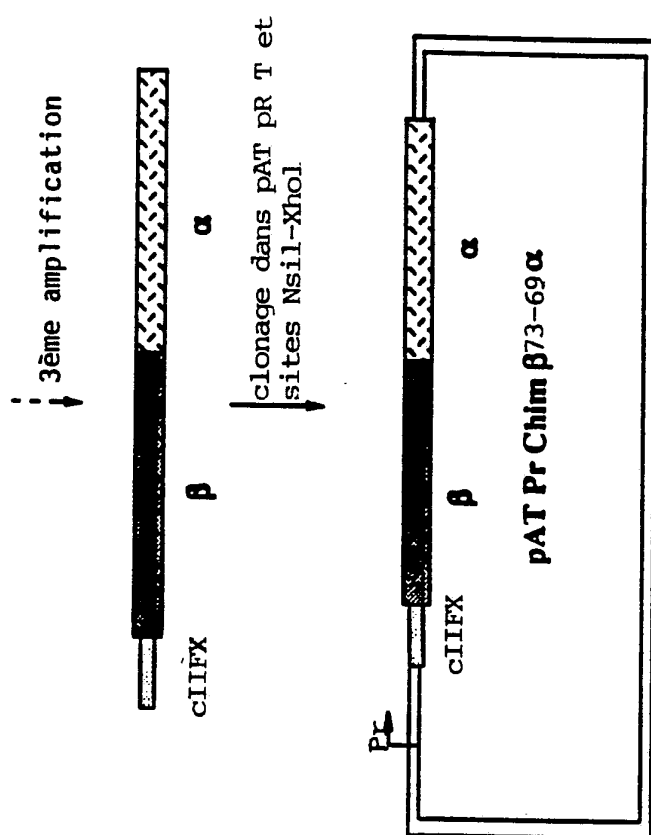


Figure 9 (suite)