

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 549 082

②① N° d'enregistrement national :

83 11594

⑤① Int Cl⁴ : C 12 N 15/00; C 12 P 21/00.

①②

DEMANDE DE CERTIFICAT D'ADDITION À UN BREVET D'INVENTION

A2

②② Date de dépôt : 12 juillet 1983.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 3 du 18 janvier 1985.

⑥① Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés : 1^{re} addition au brevet 83 00909 pris le 21 jan-
vier 1983.

⑦① Demandeur(s) : *TRANSGENE S.A.* — FR.

⑦② Inventeur(s) : Michael Courtney, Anne Buchwalder, Luc
Henri Tessier, Michael Jaye, Richard Lathe, Paul Tolstos-
hev et Jean Pierre Lecocq.

⑦③ Titulaire(s) :

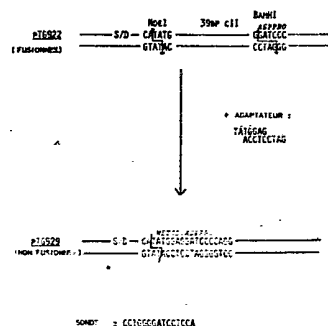
⑦④ Mandataire(s) : Regimbeau, Corre, Martin, Schrimpf,
Warcoin et Ahner.

⑤④ Vecteurs perfectionnés d'expression d'une protéine ayant l'activité de l'antitrypsine- α_1 humaine.

⑤⑦ La présente invention concerne notamment un plasmide
selon la revendication 1 du brevet principal, caractérisé en ce
qu'il comporte au voisinage du codon de départ de la traduc-
tion du gène codant pour l'antitrypsine- α_1 la structure
suivante :

CATATGGAGGATCCCCAGG
GTATACCTCCTAGGGGTCC

de façon que le codon de départ de la traduction soit en
phase pour la traduction du gène.



FR 2 549 082 - A2

La présente invention concerne un perfectionnement aux vecteurs d'expression d'une protéine ayant l'activité de l'antitrypsine- α_1 humaine.

5 Le brevet principal décrit un procédé permettant de produire, par fermentation bactérienne, une antitrypsine- α_1 humaine qui permet le traitement de patients présentant des syndromes de déficience en antitrypsine- α_1 .

10 Toutefois, la protéine ayant l'activité de l'antitrypsine- α_1 humaine préparée par ce procédé comporte une séquence d'acides aminés fusionnée à l'extrémité N-terminale de la protéine antitrypsine- α_1 . L'injection d'un tel produit peut dans certains cas provoquer une réponse immunitaire du patient.

15 Afin d'éviter cet inconvénient, il est intéressant de pouvoir exprimer, dans la bactérie, le gène naturel non fusionné de l'antitrypsine- α_1 humaine.

20 Pour ce faire, dans les vecteurs de l'invention on prévoit au voisinage du codon de départ de la traduction du gène codant pour l'antitrypsine- α_1 humaine la structure suivante :

-CATATGGAGGATCCCCAGG-
-GTATACCTCCTAGGGGTCC-

de façon que le codon de départ de la traduction soit en phase pour la traduction du gène.

5 Un tel plasmide permettant la préparation d'une anti-trypsin- α_1 non fusionnée peut être obtenu, par exemple, par modification du plasmide pTG922 qui conduit, lui, à la préparation d'une protéine fusionnée.

10 Comme cela est représenté dans la figure 1, les nucléotides codant pour l'extrémité N-terminale de la séquence cII du gène de l'antitrypsine- α_1 fusionné dans pTG922 sont liés par des sites de restriction uniques NdeI et BamHI.

15 On élimine l'ADN situé entre ces deux sites par clivage du plasmide avec NdeI et BamHI puis remise en continuité du plasmide de façon que le codon de départ de la traduction soit fusionné en phase directement au début de la séquence codant pour l'antitrypsine- α_1 .

Cette remise en continuité est obtenue en utilisant un oligonucléotide adaptateur synthétique qui permet :

- 20 a) la fusion des sites NdeI et BamHI ;
b) la reconstitution du codon de départ et
c) l'addition d'un codon codant pour l'acide glutamique à l'extrémité N-terminale de la protéine mature, lequel manquait dans la construction de pTG922 dont la construction
25 est décrite dans le brevet principal.

L'exemple suivant permettra de mettre en évidence d'autres caractéristiques du présent perfectionnement.

EXEMPLE

30 Les différents matériels et méthodes mis en oeuvre dans le cadre de cet exemple ont déjà été décrits dans le

cadre du brevet principal.

Le plasmide de départ est le plasmide pTG922 décrit au brevet principal.

5 Le plasmide pTG922 est soumis à une restriction complète avec les enzymes de restriction NdeI (New England Biolabs) et BamHI (Bethesda Research Labs) en utilisant les conditions qui sont indiquées par le fournisseur.

10 On synthétise par des procédés connus des oligonucléotides adaptateurs complémentaires non phosphorylés ayant la structure suivante :

5'-dTATGGAG-3' et 5'-dGATCCTCCA-3'.

15 Ces oligonucléotides sont préhybridés puis soumis à la ligation à 4°C avec le plasmide pTG922 qui a été soumis à la restriction enzymatique dans un rapport molaire de 50:1 en utilisant de l'ADN ligase dans des conditions connues.

Le mélange de ligation est utilisé pour transformer des cellules compétentes de la souche TGE900 et les transformants obtenus sont étalés sur un milieu de culture en présence d'ampicilline.

20 Les colonies sont sélectionnées sur des filtres de nitrocellulose par hybridation avec une sonde marquée à la T4 polynucléotide kinase 5'-dCCTGGGATCCTCCA-3'. Cette sonde complé-
25 mente entièrement la construction non fusionnée que l'on désire sélectionner mais ne complémente que 7 des nucléotides du plasmide parental pTG922, ceci est insuffisant pour assurer une hybridation.

On obtient ainsi 6 candidats positifs.

30 Ceux-ci sont mis en culture à 28°C et à 42°C et les extraits préparés sont testés pour leur activité anti-élastase comme cela a été décrit dans le brevet principal.

Les résultats sont rassemblés au tableau ci-joint.

TABLEAU

	<u>PLASMIDE</u>	<u>TEMPERATURE</u>	<u>% D'INHIBITION D'ELASTASE</u>
5	pTG920	28°C	5
		42°C	4,2
	pTG922	28°C	93,6
		42°C	98,9
	pTG929 ⁽¹⁾	28°C	4,9
		42°C	60
10	pTG929 ⁽²⁾	28°C	17,7
		42°C	64,4

pTG920 est le vecteur seul sans la séquence docant pour l'anti-
 trypsine- α_1 ,
 pTG922 a été décrit au brevet principal,
 pTG929 (1) et (2) sont différents clones préparés par le procédé
 de la présente invention.

Les résultats précédents démontrent que les plasmides
 selon l'invention assurent l'expression d'une antitrypsine- α_1
 humaine non fusionnée dans Escherichia coli.

La diminution du niveau d'expression de l'antitrypsine-
 α_1 humaine dans le plasmide pTG929 par rapport au plasmide
 pTG922 est probablement due à la disparition d'une partie de
 la séquence de cII.

REVENDICATIONS

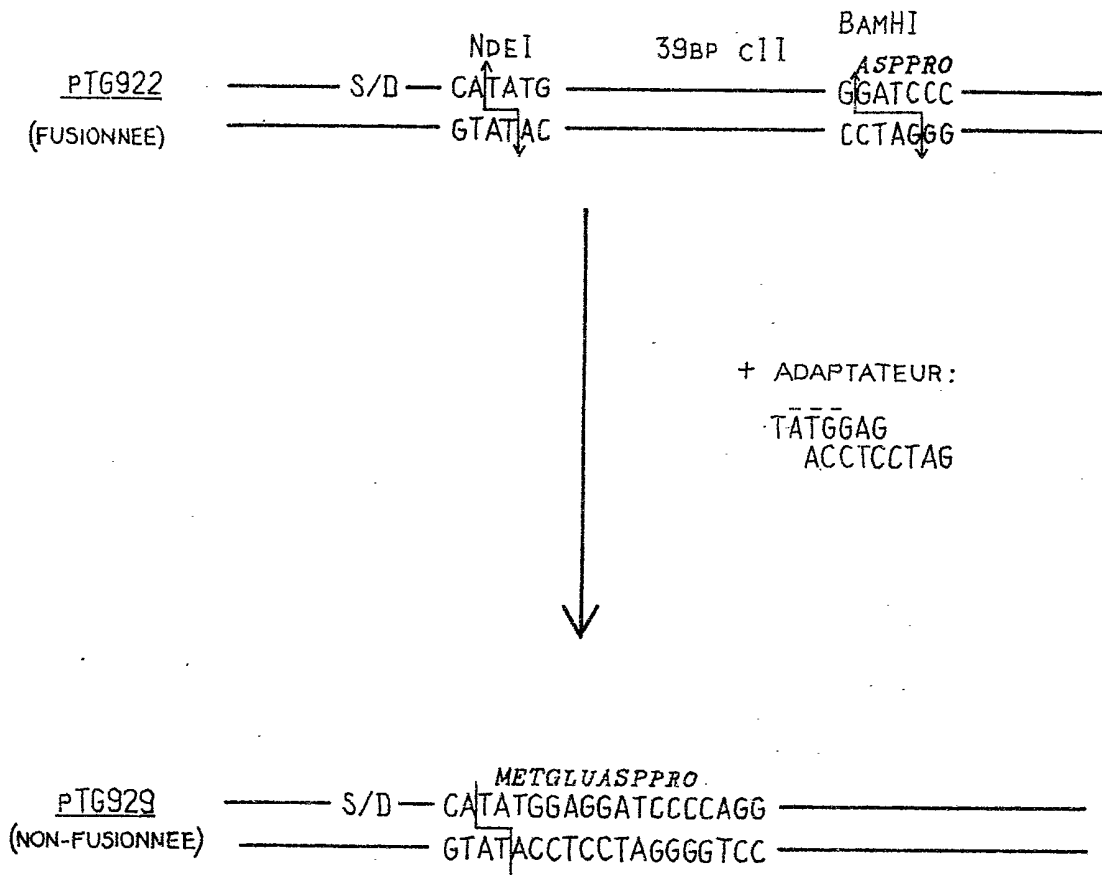
5 1) Plasmide selon la revendication 1 du brevet principal, caractérisé en ce qu'il comporte au voisinage du codon de départ de la traduction du gène codant pour l'antitrypsine- α_1 la structure suivante :

-CATATGGAGGATCCCCAGG-
-GTATACCTCCTAGGGGTCC-

de façon que le codon de départ de la traduction soit en phase pour la traduction du gène.

10 2) Plasmide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pTG929.

1/1



SONDE : CCTGGGGATCCTCCA

FIG_1