CH 659826 A5

(19) CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

(11) CH 659826 A5

(51) Int. Cl.[4]: C 12 N 15/00
C 12 P 21/02
C 07 K 7/32

// (C 12 N 15/00, C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02, C 12 R 1:19)

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

(12) FASCICULE DU BREVET A5

(21) Numéro de la demande: 3267/82

(22) Date de dépôt: 27.05.1982

(30) Priorité(s): 02.06.1981 JP 56-84604
02.06.1981 JP 56-84603
04.02.1982 JP 57-16734

(24) Brevet délivré le: 27.02.1987

(45) Fascicule du brevet publié le: 27.02.1987

(73) Titulaire(s):
Wakunaga Yakuhin Kabushiki Kaisha,
Osaka-shi/Osaka-fu (JP)

(72) Inventeur(s):
Suzuki, Masanori, Hiroshima-shi/Hiroshima-ken (JP)
Miyaka, Tetsuo, Takata-gun/Hiroshima-ken (JP)
Miyoshi, Kenichi, Takata-gun/Hiroshima-ken (JP)
Sumi, Shinichiro, Takata-gun/Hiroshima-ken (JP)
Hasegawa, Akira, Takata-gun/Hiroshima-ken (JP)
Nishizawa, Tsutomu,
Hiroshima-shi/Hiroshima-ken (JP)
Fuwa, Toru, Hiroshima-shi/Hiroshima-ken (JP)

(74) Mandataire:
William Blanc & Cie conseils en propriété industrielle S.A., Genève

(54) Procédé d'obtention d'un microorganisme transformé par un plasmide comprenant un gène de structure de la 27-désamidosécrétine.

(57) On prépare la 27-désamidosécrétine par une technique de recombinaison de l'ADN comprenant la synthèse chimique d'un gène de structure de la désamidosécrétine, l'insertion de ce gène dans un plasmide vecteur capable de proliférer dans l'E. coli, de façon à produire, un plasmide chimère, la transformation de la souche d'E. coli par ce plasmide chimère, la culture de la souche d'E. coli ainsi transformée et la récupération de la 27-désamidosécrétine produite.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention d'une souche d'un micro-organisme transformé par un plasmide comprenant un gène de structure d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine, caractérisé par le fait qu'il comprend les opérations suivantes:

(1) synthèse chimique d'un gène de structure d'une désamidosécrétine corerspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine,

(2) insertion de ce gène dans un plasmide vecteur capable de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée, de façon à produire un plasmide chimère capable de proliférer dans cette cellule, et

(3) transformation de la cellule-hôte par ce plasmide chimère.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la cellule-hôte est un *E. coli* appartenant au genre *Escherichia.*

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que l'*E. coli* est l'*E. coli* K 12C600, FERM BP-115.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le plasmide vecteur est le plasmide pBR322.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que le plasmide chimère est le pMG dans lequel ledit gène de structure est incorporé au site de reconnaissance *Pst* I du plasmide pBR322.

6. Procédé d'obtention d'une souche d'un micro-organisme transformé par un plasmide comprenant un gène de structure d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine, caractérisé par le fait qu'il comprend les opérations suivantes:

(1) synthèse chimique d'un gène de structure d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine,

(2) obtention d'un plasmide vecteur capable d'utiliser l'opéron lactose et capable, en outre, de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée,

(3) insertion de ce gène de structure dans le plasmide vecteur de façon à produire un plasmide chimère capable de proliférer dans cette cellule, et

(4) transformation de la cellule-hôte par ce plasmide chimère.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que la cellule-hôte est un *E. coli* appartenant au genre *Escherichia.*

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que la cellule-hôte est l'*E. coli* XA35, FERM BP-116 qui est une souche dans laquelle le gène de la β-galactosidase fait défaut et dans laquelle le gène i fait également défaut.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que l'opéron lactose provient de l'*E. coli.*

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que le plasmide vecteur contient la totalité ou une partie de l'opéron lactose de l'ADN du chromosome de l'*E. coli* et qu'il est capable de proliférer dans l'*E. coli.*

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que le plasmide vecteur est préparé à partir d'un phage transducteur, contenant la totalité ou une partie de l'opéron lactose, et d'un plasmide provenant de l'*E. coli.*

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le fait que le phage transducteur est choisi parmi les phages suivants: pldl, F′-lac, Ø80 dplac, λh80dlac et λplac.

13. Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le fait que le plasmide provenant de l'*E. coli* est choisi parmi les plasmides suivants: pBR 322, pSC 101 et λdvl.

14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé par le fait que le phage est le λplac 5.

15. Procédé selon la revendication 13, caractérisé par le fait que le plasmide est le pBR 322.

16. Procédé selon la revendication 14, ou la revendication 15, caractérisé par le fait que le plasmide vecteur est le pRE qui est constitué par le fragment de 3,8 Md du λplac 5 lié au plus grand des fragments obtenus par digestion du pBR 322 avec *Eco* RI et *Hind* III.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé par le fait que le plasmide chimère est le pLS qui est un produit d'insertion dudit gène de structure dans le plasmide pRE en son site de reconnaissance de l'*Eco* RI.

18. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le gène de structure est un gène exprimant la 27-désamidosécrétine, faisant partie d'un polydéoxyribonucléotide double-brin.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé par le fait que le gène de structure présente la séquence des bases suivantes:

```
His   Ser   Asp   Gly   Thr   Phe   Thr
CAC - TCA - GAT - GGT - ACT - TTC - ACC -
GTG - AGT - CTA - CCA - TGA - AAG - TGG -

Ser   Glu   Leu   Ser   Arg   Leu   Arg
TCA - GAA - CTA - TCT - CGT - CTA - CGT -
AGT - CTT - GAT - AGA - GCA - GAT - GCA -

Asp   Ser   Ala   Arg   Leu   Gln   Arg
GAT - TCA - GCA - CGC - CTC - CAG - CGC -
CTA - AGT - CGT - GCG - GAG - GTC - GCG -

Leu   Leu   Gln   Gly   Leu   Val
TTG - CTG - CAA - GGT - CTC - GTT -
AAC - GAC - GTT - CCA - GAG - CAA -
```

20. Procédé selon la revendication 18 ou la revendication 19, caractérisé par le fait que le gène de structure contient un codon désignant la méthionine, à son extrémité 5′, et un ou plusieurs codons pour désigner un arrêt de translation, à son extrémité 3′.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé par le fait que l'extrémité 5′ du codon méthionine et l'extrémité 3′ du codon d'arrêt de translation du gène de structure ont 3m (3m+1) ou (3m+2) paires de bases (m étant égal à 0 ou à un nombre entier au moins égal à 1), ces bases étant choisies au hasard.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé par le fait que le polydéoxyribonucléotide double-brin a une séquence de bases de reconnaissance de tout enzyme de restriction désiré à ses deux extrémités et présente, à l'extérieur des extrémités résultantes, au moins deux paires de bases de façon à produire des extrémités émoussées choisies au hasard.

23. Procédé selon la revendication 18, caractérisé par le fait que le polydéoxyribonucléotide double-brin a la structure suivante:

```
                Met
ACCTGCAGCC - ATG -
TGGACGTCGG - TAC -

His   Ser   Asp   Gly   Thr   Phe   Thr
CAC - TCA - GAT - GGT - ACT - TTC - ACC -
GTG - AGT - CTA - CCA - TGA - AAG - TGG -

Ser   Glu   Leu   Ser   Arg   Leu   Arg
TCA - GAA - CTA - TCT - CGT - CTA - CGT -
AGT - CTT - GAT - AGA - GCA - GAT - GCA -

Asp   Ser   Ala   Arg   Leu   Gln   Arg
GAT - TCA - GCA - CGC - CTC - CAG - CGC -
CTA - AGT - CGT - GCG - GAG - GTC - GCG -

Leu   Leu   Gln   Gly   Leu   Val
TTG - CTG - CAA - GGT - CTC - GTT -
AAC - GAC - GTT - CCA - GAG - CAA -

FIN   FIN
TGA - TAG - GGCTGCAGGT
ACT - ATC - CCGACGTCCA.
```

24. *Escherichia coli* transformé par un plasmide dans lequel est incorporé un gène de structure, de la désamidosécrétine, correspondant au polypeptide dont l'acide aminé situé à l'extrémité C est la valine, ce plasmide étant capable de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée, obtenue par le procédé selon la revendication 1.

25. *Escherichia coli* transformé par un plasmide dans lequel est incorporé un gène de structure, de la désamidosécrétine, correspondant au polypeptide dont l'acide aminé situé à l'extrémité C est la valine, ce plasmide étant capable d'utiliser l'opéron lactose et étant également capable de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée, obtenue par le procédé selon la revendicaton 6.

26. *E. coli* selon la revendication 25, caractérisé par le fait qu'il est l'*E. coli* XA35 (pLS58), ATCC 39040.

27. Procédé de production de 27-désamidosécrétine, caractérisé par l'utilisation de l'*Escherichia coli* transformé, selon l'une des revendications 24 à 26, comprenant la culture de l'*E. coli* transformé et la récupération de la désamidosécrétine produite.

28. 27-désamidosécrétine consistant en un polypeptide représenté par la séquence d'acides aminés suivante:

His - Ser - Asp - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Glu - Leu -
Ser - Arg - Leu - Arg - Asp - Ser - Ala - Arg - Leu - Gln -
Arg - Leu - Leu - Gln - Gly - Leu - Val - OH

dans laquelle Val-OH indique que l'extrémité C du polypeptide consistant en valine est un acide carboxylique, obtenu par le procédé selon la revendication 27.

29. Plasmide chimère, comprenant un gène de structure exprimant la 27-désamidosécrétine, en tant que produit intermédiaire dans le procédé de préparation selon la revendication 1.

30. Plasmide chimère, comprenant un gène de structure exprimant la 27-DAS en tant que produit intermédiaire dans le procédé de préparation selon la revendication 6.

31. Polydéoxyribonucléotide double-brin, comprenant un gène de structure exprimant la 27-désamidosécrétine, en tant que produit intermédiaire dans le procédé de préparation selon la revendication 1.

32. Polydéoxyribonucléotide double-brin selon la revendication 31, caractérisé par le fait que le gène de structure présente la séquence des bases suivantes:

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr
CAC - TCA - GAT - GGT - ACT - TTC - ACC -
GTG - AGT - CTA - CCA - TGA - AAG - TGG -

Ser Glu Leu Ser Arg Leu Arg
TCA - GAA - CTA - TCT - CGT - CTA - CGT -
AGT - CTT - GAT - AGA - GCA - GAT - GCA -

Asp Ser Ala Arg Leu Gln Arg
GAT - TCA - GCA - CGC - CTC - CAG - CGC -
CTA - AGT - CGT - GCG - GAG - GTC - GCG -

Leu Leu Gln Gly Leu Val
TTG - CTG - CAA - GGT - CTC - GTT -
AAC - GAC - GTT - CCA - GAG - CAA -

33. Polydéoxyribonucléotide double-brin selon la revendication 31 ou la revendication 32, caractérisé par le fait que le gène de structure contient un codon désignant la méthionine, à son extrémité 5', et un ou plusieurs codons pour désigner un arrêt de traduction, à son extrémité 3'.

34. Polydéoxyribonucléotide double-brin selon la revendication 33, caractérisé par le fait que l'extrémité 5' du codon méthionine et l'extrémité 3' du codon d'arrêt de traduction ont 3m, (3m+1) ou (3m+2) paires de bases (m étant égal à 0 ou à un nombre entier au moins égal à 1), ces bases étant choisies au hasard.

35. Polydéoxyribonucléotide double-brin selon la revendication 34 ayant une séquence de bases de reconnaissance de tout enzyme de restriction désiré à ses deux extrémités et ayant, à l'extérieur des extrémités résultantes, au moins deux paires de bases de façon à produire des extrémités émoussées choisies au hasard.

36. Polydéoxyribonucléotide double-brin selon la revendication 31, ayant la structure suivante:

Met
ACCTGCAGCC - ATG -
TGGACGTCGG - TAC -

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr
CAC - TCA - GAT - GGT - ACT - TTC - ACC -
GTG - AGT - CTA - CCA - TGA - AAG - TGG -

Ser Glu Leu Ser Arg Leu Arg
TCA - GAA - CTA - TCT - CGT - CTA - CGT -
AGT - CTT - GAT - AGA - GCA - GAT - GCA -

Asp Ser Ala Arg Leu Gln Arg
GAT - TCA - GCA - CGC - CTC - CAG - CGC -
CTA - AGT - CGT - GCG - GAG - GTC - GCG -

Leu Leu Gln Gly Leu Val
TTG - CTG - CAA - GGT - CTC - GTT -
AAC - GAC - GTT - CCA - GAG - CAA -

FIN FIN
TGA - TAG - GGCTGCAGGT
ACT - ATC - CCGACGTCCA.

La présente invention concerne un procédé d'obtention d'une souche d'un micro-organisme transformé par un plasmide comprenant un gène de structure d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine.

L'invention concerne également une souche d'*Escherichia coli* transformé, obtenue par ce procédé, ainsi qu'un procédé de production de 27-désamidosécrétine comprenant la culture de cette souche d'*Escherichia coli* transformé et la récupération de la 27-désamidosécrétine produite.

En outre, l'invention concerne la 27-désamidosécrétine obtenue par le procédé qui vient d'être mentionné, ainsi qu'un plasmide chimère comprenant un gène de structure, exprimant la 27-désamidosécrétine, et un polydéoxyribonucléotide double-brin, en tant que produits intermédiaires du procédé d'obtention de la souche de micro-organisme transformé.

Il s'agit donc d'un procédé de production de 27-désamidosécrétine («27» étant parfois omis dans la désignation de ce composé dans la description ci-dessous) par une technique de génie génétique en utilisant un gène pour la désamidosécrétine, obtenu par synthèse chimique.

La sécrétine est un composé connu en tant qu'une des hormones gastro-intestinales. Jusqu'à présent, on connaît des activités physiologiques de ce composé, telles que son action promotrice de la sécrétion de l'eau et du bicarbonate par le pancréas et on l'a utilisé de manière pratique pour l'évaluation de la fonction pancréatique ou comme agent thérapeutique de traitement de l'ulcère duodénal.

La sécrétine est un polypeptide ayant la formule suivante:

5 10
His - Ser - Asp - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Glu - Leu - Ser -
15 20
Arg - Leu - Arg - Asp - Ser - Ala - Arg - Leu - Gln - Arg - Leu -
25 27
Leu - Gln - Gly - Leu - Val - NH_2

En vue de l'obtention de cette sécrétine, on a mis en œuvre des procédés tels que l'extraction[1] d'une sécrétine existant à l'état naturel (habituellement, la sécrétine porcine, mais on a également déterminé que la séquence des acides aminés de la sécrétine bovine est la même que celle de la sécrétine porcine) et la synthèse chimique[2]. Toutefois, chacun de ces procédés implique des difficultés concernant le coût, la rapidité, le rendement de la production, etc. En outre, selon le procédé de l'art antérieur dans lequel on extrait et on purifie la sécrétine provenant de l'intestin grêle des cochons, il se présente une difficulté résultant du fait que le grand nombre des hormones gastro-intestinales (motiline, VIP, CCK-PZ, GIP, GLI, etc.)

fait obstacle a une détermination précise de la sécrétine par la méthode de détermination biologique ou radio-immunologique.

Entre-temps, les progrès récents des techniques dites de génie génétique, dans lesquelles on utilise un gène synthétique, sont si importants que l'on commence maintenant à produire de manière commerciale, au moyen de ces techniques, différents polypeptides ayant une activité physiolgoique. En conséquence, la possibilité de produire la sécrétine par une technique de génie génétique permettrait de découvrir des indices pouvant mener à la solution des problèmes mentionnés ci-dessus qui sont rencontrés dans les procédés de production conformes à l'art antérieur.

Toutefois, bien que l'on ait, de manière générale, établi que la production d'un polypeptide par une technique de génie génétique, en utilisant un gène synthétique, est rendue possible grâce aux opérations consistant à effectuer la synthèse chimique d'un gène structural, à insérer ce gène en tant que vecteur dans un plasmide approprié, à transformer un hôte approprié et à produire et récupérer le polypeptide désiré par culture du produit de transformation, il n'est pas forcément possible de prévoir à coup sûr si l'on peut introduire un polypeptide donné, ayant une activité physiologique désirée, au moyen de ce procédé.

Dans le cas de la sécrétine, du fait que l'extrémité C de la sécrétine polypeptide est un amide de valine, comme mentionné ci-dessus, l'extrémité du gène structural d'ADN représentant le polypeptide doit nécessairement comprendre le codon corespondant à la valine et, par conséquent, on considère que le polypeptide produit a une extrémité C constituée par la valine. Avec un tel raisonnement, il n'est pas certain que le polypeptide obtenu présentera l'activité physiologique de la sécrétine.

La présente invention résulte de la confirmation du fait qu'un gène structural exprimant un dérivé de sécrétine dont l'extrémité C est constituée par de la valine ne se trouvant pas sous forme d'amide, à savoir la désamidosécrétine, peut être obtenu par synthèse chimique, qu'un tel gène peut être inséré en tant que vecteur dans un plasmide approprié pour former un plasmide chimère, que la transformation d'une cellule-hôte appropriée par le plasmide chimère ainsi que la production et la récupération de la désamidosécrétine par culture du produit de transformation sont possibles, que la désamidosécrétine ainsi produite a une activité similaire à celle de la sécrétine et, en outre, que le système d'expression de l'opéron de lactose peut être utilisé dans la production de la désamidosécrétine et que l'on peut augmenter le rendement de désamidosécrétine, dans une large mesure, grâce à l'utilisation de ce système d'expression.

Ainsi, la 27-désamidosécrétine obtenue par le procédé selon l'invention comprend un polypeptide représenté par la séquence d'acide aminé:

His - Ser - Asp - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Glu - Leu - Ser - Arg - Leu - Arg - Asp - Ser - Ala - Arg - Leu - Gln - Arg - Leu - Leu - Gln - Gly - Leu - Val - OH

dans laquelle Val-OH montre que l'extrémité C du polypeptide comprenant la valine est un acide carboxylique.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une souche d'un micro-organisme transformé par un plasmide comprenant un gène de structure d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine, ce procédé étant caractérisé par le fait qu'il comprend les opérations suivantes:

(1) synthèse chimique d'un gène de structure d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine,

(2) insertion de ce gène dans un plasmide vecteur capable de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée, de façon à produire un plasmide chimère capable de proliférer dans cette cellule, et

(3) transformation de la cellule-hôte par ce plasmide chimère.

Le procédé de production de la 27-désamidosécrétine comprend la culture de la cellule transformée ainsi obtenue et la récupération de la désamidosécrétine produite.

Une variante préférée du procédé d'obtention de la souche de micro-organisme transformé comprend les opérations suivantes:

(1) synthèse chimique d'un gène de structure d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine,

(2) obtention d'un plasmide vecteur capable d'utiliser l'opéron lactose et capable, en outre, de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée,

(3) insertion de ce gène de structure dans le plasmide vecteur de façon à produire un plasmide chimère capable de proliférer dans cette cellule, et

(4) transformation de la cellule-hôte par ce plasmide chimère.

Ainsi, le procédé de production de 27-désamidosécrétine comprend, de manière générale, les étapes suivantes:

(1) obtention d'un plasmide chimère comprenant un fragment constitué par un gène structurel d'une désamidosécrétine correspondant à un polypeptide dans lequel l'acide aminé situé à l'extrémité C de la sécrétine est la valine, ce plasmide chimère étant capable de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée et d'exprimer le gène de structure d'une désamidosécrétine dans la cellule-hôte,

(2) transformation de la cellule-hôte par ce plasmide chimère, et

(3) culture des cellules transformées ainsi obtenues et récupération de la désamidosécrétine produite.

Un exemple caractéristique des cellules-hôtes que l'on peut utiliser dans le procédé de transformation défini ci-dessus est constitué par l'*Escherichia coli* qui appartient au genre *Escherichia*, l'opéron lactose provenant de l'*Escherichia coli*.

Ainsi, on peut définir la variante préférée du procédé de production de 27-désamidosécrétine comme un procédé comprenant la culture d'un micro-organisme producteur de désamidosécrétine, ce micro-organisme étant constitué par de l'*Escherichia coli* dans lequel on a incorporé un plasmide contenant le gène de structure de la désamidosécrétine et la récupération de la désamidosécrétine produite lors de l'utilisation de l'opéron lactose dans l'*Escherichia coli*.

L'invention concerne également une culture d'*Escherichia coli* destinée à être utilisée pour la mise en œuvre du procédé, cet *Escherichia coli* ayant été transformé de manière à présenter un phénotype tel que la culture de ce micro-organisme produise la 27-désamidosécrétine. Ainsi, l'invention concerne un *Escherichia coli* caractérisé par le fait qu'il a été transformé au moyen d'un plasmide dans lequel on a incorporé ou inséré un gène structurel, obtenu par synthèse chimique, de la désamidosécrétine correspondant au polypeptide dans lequel l'acide aminé à l'extrémité C consiste en valine, ce plasmide étant capable d'utiliser l'opéron lactose et étant également capable de proliférer dans une cellule-hôte prédéterminée.

L'invention concerne également un polydéoxyribonucléotide double-brin comprenant le gène structurel exprimant la 27-désamidosécrétine.

L'invention concerne encore un plasmide comprenant le gène structurel exprimant la 27-désamidosécrétine.

Conformément à la description de l'invention donnée ci-dessus, on peut éliminer les difficultés d'extraction et de purification rencontrées dans le cas de l'extraction de la sécrétine naturelle qui a été mise en œuvre, comme seul procédé commercialement exploitable, grâce à l'utilisation, comme matière première, de l'extrait de gène obtenu par recombinaison.

Lors de la mise en œuvre du procédé selon l'invention, il est possible de faire varier une ou plusieurs espèces d'acide aminé constituant un peptide, ce qui permet d'étudier les corrélations entre les structures et les activités des hormones peptidiques. En d'autres termes, on peut obtenir facilement tout dérivé désiré substitué par un acide aminé d'un peptide présentant une activité physiologique. On peut considérer que la formation d'un dérivé de polypeptide par manipulation génétique constitue le meilleur procédé, compte tenu du fait que la formation par synthèse chimique d'un dérivé de polypeptide à masse moléculaire élevée est très difficile à effectuer selon les procédés dont on dispose actuellement.

En outre, l'utilisation du système hôte-vecteur utilisé dans la variante préférée du procédé pour la production de la désamidosécrétine, comme mentionné ci-dessus, a rendu possible de produire de la désamidosécrétine ayant une activité de sécrétine correspondant à environ 3×10^4 molécules par cellule-hôte, ce qui peut être considéré comme un rendement approprié à une exploitation pratique. En outre, en ce qui concerne la protéine fusionnée qui sera décrite ci-dessous, on obtient un rendement de $2{,}85 \times 10^5$ molécules/cellule, ce qui constitue une valeur qui suggère que la production de la désamidosécrétine avec un rendement élevé est rendue possible par l'expression de caractère en utilisant le plasmide chimère selon l'invention dans une bactérie, sans effet destructeur (protéolytique) par les protéases.

Il existe également des polypeptides différents de la sécrétine qui ont une extrémité C sous la forme d'un amide, et la présente invention fournit une suggestion concernant la production de dérivés des amidés de tels polypeptides ainsi que l'expression de leur activité physiologique.

La 27-désamidosécrétine obtenue par le procédé selon l'invention est un polypeptide correspondant à la séquence d'acide aminé représenté par la formule (I) indiquée ci-dessous:

His - Ser - Asp - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Glu - Leu - Ser - Arg - Leu - Arg - Asp - Ser - Ala - Arg - Leu - Gln - Arg - Leu - Leu - Gln - Gly - Leu - Val - OH

Dans la formule (I), le symbole His et les autres symboles du même genre sont les symboles habituels indiquant les acides aminés tels que l'histidine, etc.

Ce polypeptide diffère du polypeptide de la sécrétine par le fait que la valine à l'extrémité C n'est pas sous la forme d'un amide (Val-NH_2) mais sous la forme d'un groupe carboxyle (Val-OH).

La désamidosécrétine, qui a une activité physiologique similaire à celle de la sécrétine, notamment l'effet de promotion de la sécrétion du suc pancréatique, peut elle-même être utilisée en tant que polypeptide ayant une activité physiologique analogue à celle de la sécrétine. D'autre part, on peut également utiliser la désamidosécrétine après amidation du groupe carboxyle à l'extrémité C de la sécrétine. L'amidation peut être effectuée par un procédé purement chimique ou bien par un procédé enzymatique ou par un procédé biologique in vivo.

Bien que l'on puisse obtenir la désamidosécrétine par modification de l'extrémité C de la sécrétine, on produit de préférence ce composé par une technique de génie génétique, conformément à la présente invention, en effectuant la synthèse chimique d'un gène structurel pour ce polypeptide, la préparation d'un plasmide permettant d'exprimer le polypeptide, la transformation d'une cellule-hôte au moyen de ce plasmide, la production du polypeptide désiré par culture des cellules transformées et la récupération de la désamidosécrétine.

La séquence de bases de l'ADN dont est constitué le gène structurel de la sécrétine est inconnue.

Par conséquent, parmi les codons qui désignent l'acide aminé constituant le peptide, ceux qui satisfont aux conditions suivantes sont choisies pour la synthèse de l'ADN:

(i) il doit être réglé de façon que la région enrichie en paires de bases A - T ne suivent pas immédiatement la région enrichie en paires de bases G - C, et

(ii) il doit également être réglé de façon que chaque fragment de synthèse, comme décrit ci-dessous, ne présente pas une séquence de bases complémentaire indésirable intramoléculairement ou intermoléculairement.

Il est également souhaitable, pour faciliter le choix des souches transformées, que le gène de structure soit agencé de manière à contenir une ou plusieurs séquences de base de reconnaissance d'enzyme de restriction. Dans le cas de la désamidosécrétine, il est préférable que le gène ait des séquences de bases de reconnaissance du type Hinf I et Hae II.

D'un point de vue de ce genre, des exemples caractéristiques de codons désignant des acides aminés dans le gène de structure de la désamidosécrétine sont les suivants:

Acide aminé	*Codon*
His	CAC
Ser	TCT, TCA
Asp	GAT
Gly	GGT
Thr	ACT, ACC
Phe	TTC
Glu	GAA
Leu	TTG, CTC, CTA, CTG, TTA, CTT
Arg	CGT, CGC
Ala	GCA
Gln	CAA, CAG
Val	GTT

En conséquence, selon une forme préférée du gène de structure de la désamidosécrétine selon l'invention, la séquence de bases est celle qui est indiquée ci-dessous dans les exemples expérimentaux ainsi que dans le schéma représentatif de la structure du gène (dans ce schéma, la séquence de bases est bien entendu le groupement allant du triplet CAC, correspondant à His, au triplet GTT, correspondant à Val).

Plus précisément, l'invention porte, en particulier, à titre de produit intermédiaire, sur un polydéoxynucléotide double-brin comprenant un gène de structure exprimant la 27-désamidosécrétine, comme mentionné ci-dessus, une forme d'exécution particulièrement avantageuse du gène de structure ayant la séquence de bases représentée ci-dessous:

```
His  Ser  Asp  Gly  Thr  Phe  Thr
CAC - TCA - GAT - GGT - ACT - TTC - ACC -
GTG - AGT - CTA - CCA - TGA - AAG - TGG -

Ser  Glu  Leu  Ser  Arg  Leu  Arg
TCA - GAA - CTA - TCT - CGT - CTA - CGT -
AGT - CTT - GAT - AGA - GCA - GAT - GCA -

Asp  Ser  Ala  Arg  Leu  Gln  Arg
GAT - TCA - GCA - CGC - CTC - CAG - CGC -
CTA - AGT - CGT - GCG - GAG - GTC - GCG -

Leu  Leu  Gln  Gly  Leu  Val
TTG - CTG - CAA - GGT - CTC - GTT -
AAC - GAC - GTT - CCA - GAG - CAA -
```

La façon d'exprimer un tel gène de structure est décrite en détail, par exemple dans la demande de brevet japonais publiée N° 92696/1979. Dans le cas où l'on utilise le plasmide pBR 322 comme plasmide dans lequel le gène doit être incorporé, la désamidosécrétine devant être exprimée en tant que protéine fusionnée avec son opéron lactamase, le site dans lequel le gène doit être incorporé est avantageusement le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Pst* I dans l'opéron. Plus précisément, le codon ATG de la méthionine qui constitue le site devant être attaqué par le bromure de cyanogène se trouve du côté de l'extrémité 5′ du gène de structure, alors qu'un ou plusieurs codons d'arrêt se trouvent à l'extrémité 3′. Par la suite, de manière à être synchronisé[3] avec le cadre commençant au codon de départ du gène lactamase, on confère au gène du côté 5′ de l'ATG des bases choisies au hasard en nombre égal $2 + 3n$ ($n = 0, 1, 2, \ldots$) ainsi qu'une séquence de bases de reconnaissance Pst I pour former des extrémités cohésives aux deux extrémités respectivement. En général, les gènes de structure sont conçus et synthétisés[4] avec leurs deux extrémités cohésives non protégées mais, si désiré, on peut bloquer ces deux extrémités, ce qui rend nécessaire de fournir deux ou plusieurs bases choisies au hasard aux parties se trouvant encore plus à l'extérieur des séquences de bases de reconnaissance afin d'augmenter la capacité d'hydrolyse de l'enzyme de restriction.

Les paires de bases facultatives devant être placées du côté 5′ du codon ATG sont des paires 3m, (3m + 1) ou (3m + 2), m étant un nombre entier égal à 0, 1 ou davantage.

Compte tenu des considérations qui précèdent, une forme d'exécution préférée du gène de désamidosécrétine qui convient pour la mise en œuvre de l'invention est telle que décrite ci-dessous dans les exemples expérimentaux.

Plus précisément, une forme particulièrement avantageuse du gène pour la désamidosécrétine a la structure représentée ci-dessous:

```
                Met
ACCTGCAGCC - ATG -
TGGACGTCGG - TAC -

His  Ser  Asp  Gly  Thr  Phe  Thr
CAC - TCA - GAT - GGT - ACT - TTC - ACC -
GTG - AGT - CTA - CCA - TGA - AAG - TGG -

Ser  Glu  Leu  Ser  Arg  Leu  Arg
TCA - GAA - CTA - TCT - CGT - CTA - CGT -
AGT - CTT - GAT - AGA - GCA - GAT - GCA -

Asp  Ser  Ala  Arg  Leu  Gln  Arg
GAT - TCA - GCA - CGC - CTC - CAG - CGC -
CTA - AGT - CGT - GCG - GAG - GTC - GCG -

Leu  Leu  Gln  Gly  Leu  Val
TTG - CTG - CAA - GGT - CTC - GTT -
AAC - GAC - GTT - CCA - GAG - CAA -

FIN  FIN
TGA - TAG - GGCTGCAGGT
ACT - ATC - CCGACGTCCA
```

Pour la synthèse du gène désignée de la manière décrite ci-dessus, on peut diviser chacun des deux brins + et − en plusieurs fragments. Ces fragments peuvent être synthétisés chimiquement et on peut ensuite lier ensemble les fragments respectifs. De préférence, on divise chaque brin en environ 16 fragments dont chacun comprend de 9 à 16 bases, de sorte qu'il y aura un chevauchement de 6 à 7 bases.

Comme procédé de synthèse de chacun des fragments, on peut mentionner le procédé au diester[5], le procédé au triester[6], le procédé en phase solide[4], le procédé en phase liquide ou le procédé dans lequel on utilise un enzyme[7]. Du point de vue du temps de synthèse, du rendement et de la purification, le procédé qui convient le mieux est le procédé en phase solide conformément au procédé au triester.

En ce qui concerne les détails de la synthèse, il y a lieu de se reporter aux références indiquées ci-dessus, des exemples expérimentaux étant décrits ci-dessous.

Lorsque que l'on effectue la synthèse d'un oligonucléotide, la séparation et la purification du produit final deviennent généralement plus difficiles lorsque la longueur du brin augmente. En particulier, selon le procédé de synthèse en phase solide, on condense par étapes successives des blocs oligonucléotides convenablement protégés et, par conséquent, on ne peut pas effectuer facilement la purification par les procédés usuels tels que la filtration de gel, l'électrophorèse de gel, l'utilisation d'une colonne d'échangeuse d'ions, la chromatographie en phase liquide à grande vitesse, etc.

Dans une colonne en phase inversée, le temps de rétention varie dans une large mesure suivant que l'oligonucléotide présente ou ne présente pas de groupe protecteur lipophile. En conséquence, lorsque l'on utilise, lors de l'étape de condensation finale, un bloc d'oligonucléotide ayant un groupe protecteur stable dans les conditions permettant l'élimination des autres groupes protecteurs et que l'on enlève ensuite ces autres groupes protecteurs, on peut obtenir un mélange d'oligonucléotides ne comprenant que les groupes protecteurs stables dans le produit final désiré. En mettant à profit la nature lipophile du groupe protecteur, on peut séparer le produit final désiré du mélange des espèces n'ayant pas réagi, par passage à travers une colonne en phase inversée, opération qui est suivie de l'élimination du groupe protecteur, de façon à produire l'oligonucléotide désiré.

En procédant ainsi, on peut séparer et purifier avec une bonne efficacité l'oligonucléotide ainsi synthétisé du mélange des espèces n'ayant pas réagi.

On peut effectuer successivement la ligature mutuelle des fragments synthétiques ainsi préparés en utilisant une ADN ligase. Pour la préparation des substrats des fragments synthétiques pour l'enzyme, il est nécessaire de phosphoryler les groupes hydroxyle 5′ dans les fragments. A cet effet, on utilise généralement une polynucléotide kinase, mais on peut également effectuer une phosphorylation chimique[5]. Alors que la ligature des fragments est généralement effectuée en utilisant une ADN ligase, il est également possible de recourir au procédé selon lequel on inactive par un procédé approprié (par exemple, imidazolylation) les groupes acides phosphoriques aux extrémités 5′ et on effectue une ligature par voie chimique avec le brin du côté opposé servant de base[9].

Lors de la mise en œuvre de la variante préférée du procédé de production de 27-désamidosécrétine selon l'invention, on peut utiliser différents plasmides contenant la totalité ou une partie de l'opéron lactose de l'ADN du chromosome d'*E. coli*, ces plasmides étant également capables de proliférer dans l'*E. coli*. On peut effectuer la préparation de ces plasmides par les procédés usuels bien connus dans le domaine de la biologie moléculaire. On peut obtenir l'ADN contenant l'opéron lactose directement à partir du chromosome d'*E. coli* mais on obtient également des phages transducteurs contenant la totalité ou une partie de l'opéron lactose (par exemple, Pldl, F′-lac, ∅80 dplac, λh80 dlac, λplac, etc.) et on peut, par conséquent, prélever de ces phages la partie nécessaire de l'opéron lactose. En outre, pour la préparation du plasmide capable de proliférer dans l'*E. coli*, il est nécessaire d'effectuer la ligature de la partie requise de l'opéron lactose indiqué ci-dessus avec un autre plasmide provenant de l'*E. coli* (par exemple pBR 322, pSC 101, λdVl) de manière à former un plasmide vecteur unique.

Dans un exemple de mise en œuvre de l'invention, on utilise le phage transducteur λplac5[23] comme opéron lactose contenant de l'ADN. On peut obtenir l'ADN du λplac5 par exemple à partir de l'*E. coli* PK 1512, qui est une bactérie lysogénique, en procédant selon un procédé connu[20]. Ce phage λplac5 correspond à la région allant de la région médiane du gène i à la région médiane du gène y de l'opéron lactose et il ne présente, avantageusement, pas d'autres gènes d'*E. coli* que l'opéron lactose[20]. Par conséquent, ce phage convient particulièrement bien pour la mise en œuvre de l'invention. Comme plasmide provenant d'*E. coli*, on utilise le pBR 322 qui est choisi à cause du fait qu'il constitue l'un des plasmides les plus faciles à obtenir, que sa séquence de bases est bien connue et qu'il présente des gènes de marquage résistant à l'ampicilline et résistant à la tétracycline. En outre, lorsque l'on effectue la ligature de ces gènes, chacun des gènes (λplac5 et pBR322) est traité par les enzymes de restriction EcoRI et HindIII et l'on prélève, respectivement, le fragment de 3,8 Md (mégadaltons[15]) pour λplac5 et le fragment plus gros[16] pour pBR322, que l'on ligature ensemble pour la préparation du plasmide vecteur désiré. On désigne, dans la présente description, ce vecteur par les lettres pRE.

On a choisi l'opéron lactose du chromosome d'*E. coli* pour l'expression de la désamidosécrétine désirée en raison du fait qu'un gène étranger peut être inséré dans le gène z de l'opéron lactose, au site de reconnaissance de l'enzyme de restriction de l'EcoRI en vue de son expression sous la forme d'une protéine fusionnée avec la β-galactosidase[4a, 17], qu'une protéine peut être produite en grande quantité, que la production induite peut être effectuée en utilisant un micro-organisme-hôte approprié et que le produit ainsi obtenu peut être récupéré facilement et de manière stable sous la forme d'une protéine fusionnée à l'état pratiquement pur.

Par conséquent, il est souhaitable que le vecteur préparé par le procédé selon l'invention présente un seul site de reconnaissance de l'enzyme de restriction EcoRI et, à cet effet, on utilise des fragments d'ADN obtenus par coupure du λplac5 et du pBR322 au moyen de

l'EcoRI et de HindIII, respectivement, comme décrit ci-dessus, ces fragments étant à leur tour ligaturés ensemble.

On effectue la préparation du plasmide chimère de la manière suivante:

On incorpore le gène de structure de désamidosécrétine, indiqué ci-dessus, dans une position appropriée, dans le vecteur conçu pour l'expression d'un gène étranger, conformément à la description qui précède. On peut effectuer l'opération d'incorporation elle-même selon un procédé bien connu dans le domaine de la biologie moléculaire. En ce qui concerne les détails au sujet du procédé utilisé, il y a lieu de se reporter aux exemples expérimentaux donnés plus bas.

Conformément à un mode de mise en œuvre de l'invention, on utilise le pBR322 comme plasmide vecteur et on incorpore le gène au site de reconnaissance PstI de ce plasmide de façon à produire un plasmide chimère. Dans la présente description, on désigne le plasmide chimère par pMG. Les principales raisons qui ont motivé le choix du PBR322 comme plasmide vecteur consistent dans le fait que ce plasmide est l'un de ceux que l'on obtient le plus facilement, que sa séquence de bases est bien connue et qu'il présente des gènes de marquage résistant à l'ampicilline et résistant à la tétracycline. Le plasmide pBR322 a été déposé auprès de l'American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, U.S.A., sous le numéro de référence ATCC37017. Les principales raisons qui ont motivé le choix du site PstI comme lieu de l'incorporation du gène consiste dans le fait qu'il permet l'utilisation en tant que tel de l'opéron lactamase, qu'il permet une recherche facile du produit de transformation du fait que la résistance à l'ampicilline (Ap^r) est changée en sensibilité à l'ampicilline (Ap^s) et qu'il y a seulement un site PstI dans le plasmide pBR322.

Dans le mode de mise en œuvre préférentiel du procédé de production de la 27-désamidosécrétine, décrit ci-dessus, on utilise, comme plasmide vecteur, le pREl, qui sera décrit plus en détail ci-dessous, et on incorpore un gène, contenant le gène de structure de la désamidosécrétine, en son site de reconnaissance de l'EcoRI, de manière à produire un plasmide chimère. Dans la présente description, on désigne ce plasmide chimère par pLS.

Toujours dans ce mode de mise en œuvre préféré du procédé, on utilise de préférence le gène contenant le gène de structure indiqué ci-dessus, c'est-à-dire, le gène ayant la séquence des bases indiquées dans le schéma. Afin d'incorporer ce gène, qui présente des sites de reconnaissance de l'enzyme de restriction PstI, à ses deux extrémités, dans le plasmide pREl, il est nécessaire de convertir les sites de reconnaissance de l'enzyme de restriction PstI en sites de reconnaissance de l'enzyme EcoRI.

Ainsi, conformément à ce mode de mise en œuvre préférentiel du procédé de production de désamidosécrétine, un ADN double-brin est nécessaire pour constituer la séquence intercalaire (espaceur) entre le gène contenant le gène de structure et le plasmide pREl. Plus précisément, l'ADN double-brin est nécessaire afin d'avoir deux sites de reconnaissance des enzymes de restriction PstI et EcoRI, les paires de bases entre les deux sites de reconnaissance des enzymes de restriction étant $3n + 1$ ($n = 1, 2, 3$, etc.) de manière à être synchronisé avec le cadre de lecture pour la traduction commençant avec le codon de départ du gène de la β-galactosidase (la nature des paires de bases pouvant être choisie au hasard, du moment qu'aucun codon incohérent n'apparaît).

Il est toutefois seulement nécessaire que la partie correspondant à l'espaceur présente finalement la fonction indiquée ci-dessus et il est possible d'obtenir l'espaceur par le procédé de synthèse du gène de structure indiqué ci-dessus. Conformément à un mode de mise en œuvre de l'invention, constituant un exemple d'un procédé de synthèse de ce genre, on a obtenu l'espaceur en procédant de la manière décrite ci-dessous.

Tout d'abord, on élabore la structure d'un ADN simple-brin, conformément au schéma indiqué ci-dessous, cet ADN ayant des sites de reconnaissance des enzymes de restriction *Pst*I et *Eco*RI.

5′ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 3′
C T G A A T T C A G C T C T G C A G A G

Eco RI *Pst* I

Les bases en position 1, 2, 9-12, 19, 20 peuvent être choisies au hasard, du moment qu'elles satisfont aux conditions suivantes:

Condition (1): 1 et 10, 2 et 9, 11 et 20, et 12 et 19, sont chacune des paires de bases complémentaires aux autres;

Condition (2): la séquence de 9, 10, 11 n'est pas un codon incohérent.

L'ADN simple-brin ainsi conçu (désigné, dans la présente description, par le terme de fragment de préliaison) permet, grâce à la complémentarité qui lui est propre, d'obtenir une structure d'ADN double-brin à longue chaîne ayant un certain nombre de coudes (partie coupée sans intervalle vide formé sur l'un des deux bras de l'ADN). En conséquence, on peut former à partir de cette structure un ADN double-brin sans espace vide en faisant agir sur lui une ADN ligase. L'ADN double-brin ainsi préparé est un polyADN double-brin présentant de manière alternée les sites de reconnaissance des enzymes de restriction *Pst*I et *Eco*RI, c'est-à-dire la séquence des bases 1, 20 indiquée ci-dessus.

On peut donc obtenir, par traitement de l'ADN double-brin par l'enzyme de restriction PstI, un fragment de liaison de *Pst*I - *Eco*RI - *Pst* I ayant des extrémités cohésives.

De manière générale, un fragment de liaison présentant des sites de reconnaissance de deux enzymes de restriction est susceptible d'utilisations diverses qui ont été réalisées, conformément à l'art antérieur, en utilisant deux espèces différentes d'oligomère. Les indications données dans la présente description permettent l'obtention du même résultat en utilisant une seule sorte d'oligomère, conformément au procédé décrit ci-dessus, l'ADN à brin unique étant capable d'expression comme représenté ci-dessous:

$X'_n...X'_2\ X'_1$ | enzyme de restriction A site de reconnaissance |
$X_1X_2..X_nY_m$

$...Y_2\ Y_1$ | enzyme de restriction B site de reconnaissance |
$Y'_1Y'_2..Y'_m$

X et X′, Y et Y′ représentant chacun l'une quelconque des bases désirées (A, G, C, T) mutuellement complémentaires (n et m = 0, 1, 2, etc.).

En l'occurrence, A représente l'enzyme *Eco*RI et B représente l'enzyme *Pst*I, et $n + m = 3p + 1$ ($p = 1, 2$, etc.), p étant de préférence égal à 1 ou 2.

On peut déterminer la direction du gène de 27-désamidosécrétine incorporée dans le plasmide par coupure au site spécifique du gène de structure au moyen d'un enzyme (Hae II) ayant la propriété de reconnaître ce site spécifique, coupure d'un autre site en une position donnée à l'extérieur du gène de structure et analyse des dimensions du fragment obtenu.

Comme exemple caractéristique de la cellule-hôte que l'on peut transformer en utilisant un plasmide chimère dans lequel est incorporé le gène de structure de la désamidosécrétine, comme décrit ci-dessus, tel que le pMG décrit plus haut, on peut citer par la souche d'*E. coli* K12C600 (FERM BP - 115, déposée auprès de l'Institute of Fermentation Research, Agency of Industrial Science and Technology, Japan). La souche d'*E. coli* K12C600 est décrite dans la littérature[24] et ses propriétés bactériologiques sont également décrites dans cette référence.

Un autre exemple de plasmide chimère dans lequel est incorporé le gène de structure de la désamidosécrétine, comme décrit plus haut, est constitué par un pLS tel que le pLS58 qui peut être utilisé dans un mode de mise en œuvre préférentiel de l'invention pour la production de la désamidosécrétine. Un exemple caractéristique de la cellule-hôte que l'on peut transformer en utilisant le pLS58 est

constitué par la souche d'*E. coli* XA35, appartenant au genre *Escherichia coli*, cette souche ayant été obtenue à partir de la souche connue, K12 d'*Escherichia coli*[22] et ayant les propriétés indiquées ci-dessous, ses autres propriétés n'étant pas différentes de celles de la souche K12:

$$[Sm^r, Lac^- (i_3^-, z^-)]$$

La transformation au moyen d'un plasmide chimère dans lequel est incorporé le gène de structure de la désamidosécrétine, selon l'invention, est possible dans le cas de toutes les souches d'*E. coli*. Toutefois, afin d'obtenir la désamidosécrétine sous la forme d'une protéine fusionnée avec la β-galactosidase, on utilise de préférence une souche dans laquelle le gène de la β-galactosidase fait défaut, afin d'éviter la présence de β-galactosidase normale en mélange avec la protéine. De façon générale, la production de la protéine est réglée par le gène répresseur (gène i) d'opéron lactose. En conséquence, lorsque l'on utilise un genre d'*E. coli* sauvage, la production induite de la protéine fusionnée est possible au moyen d'un inducteur, par exemple l'IPTG (isopropyl thiogalactoside). Lorsque l'on utilise une souche présentant un gène de sensibilité aux températures élevées, on peut induire la production de la protéine fusionnée en élevant la température. Lorsque l'on utilise une souche dans laquelle la gène i fait défaut, on peut toujours produire la protéine fusionnée[18].

Conformément au mode préféré de mise en œuvre du procédé de production de désamidosécrétine selon l'invention, on utilise la souche XA35 d'*E. coli* qui est une souche dans laquelle les gènes de la β-galactosidase et le gène i font défaut.

Il est également à remarquer que la transformation avec le plasmide dans lequel est incorporé le gène de structure de la désamidosécrétine n'est pas limitée au cas où l'hôte est constitué par l'*E. coli* mais que l'on peut également choisir un hôte approprié dans une gamme plus étendue d'espèces bactériennes, en choisissant un vecteur approprié, comme il est bien connu dans le domaine de la biologie moléculaire. Un exemple caractéristique d'une telle cellule-hôte est décrit dans la demande de brevet publié N° 92696/1979, mentionnée plus haut.

On peut effectuer l'opération de transformation elle-même selon les techniques usuelles bien connues dans le domaine de la biologie moléculaire. En ce qui concerne les détails au sujet du procédé utilisé, il y a lieu de se reporter aux exemples expérimentaux décrits ci-dessous.

Un exemple caractéristique de cellules transformées est constitué par les cellules obtenues par transformation de la souche K12C600 par le plasmide chimère pMG. Dans la présente description, ces cellules transformées sont désignées par la dénomination K12C600 (pMG103).

Les propriétés génétiques des cellules transformées K12C600 (pMG103) sont les suivantes:

$$[m^-, r^-, F^-, lacY, Leu, Thr, tonA, supE, recBC]$$

Un autre exemple de cellules transformées est constitué par celles qui sont obtenues en transformant la souche XA35 d'*E. coli*, ces cellules transformées pouvant être utilisées dans le mode préférentiel de mise en œuvre du procédé de fabrication de désamidosécrétine selon l'invention, en utilisant le plasmide chimère pLS58. Ces cellules transformées sont désignées, dans la présente description, par le terme *E. coli* XA 35 (pLS 58).

La souche XA35 (pLS58) d'*E. coli* transformée diffère de la souche XA35 d'*E. coli* en ce qui concerne les propriétés suivantes, comme cela a pu être mis en évidence dans les exemples expérimentaux décrits par la suite:

$$[Ap^r, Lac^+]$$

On peut produire la désamidosécrétine en effectuant la culture, conformément à un procédé usuel, des bactéries transformées obtenues comme décrit ci-dessus. En ce qui concerne les détails au sujet de ce procédé, on peut se reporter aux exemples expérimentaux décrits par la suite.

Exemples expérimentaux

Exemple 1:

Elaboration de la structure du gène de désamidosécrétine

On élabore la structure d'un gène ayant la séquence de bases constituée par la combinaison de blocs A, B et C, comme représenté dans le schéma annexé. Ces blocs comprennent respectivement les fragments indiqués ci-dessous:

Bloc	*Fragment*
A	S-1, S-4, S-6
B	S-5, S-7, - S-10, S-12
C	S-11, S-13 - S-16

Pour l'élaboration de la structure du gène, on procède comme décrit ci-dessous:

(1) *Sélection des codons*

Les codons sont choisis comme représenté sur le schéma.

(2) On ajoute le codon ATG pour la méthionine à l'extrémité N de sorte que le polypeptide obtenu par synthèse sera coupé en ce site par le traitement chimique (+ CNBr).

(3) On ajoute, à l'extrémité C, deux codons de terminaison de translation (TAG ou TGA) de sorte qu'il n'y a pas de production de peptides inutiles.

(4) Afin de permettre la synchronisation avec le cadre commençant avec le codon de départ du gène de lactamase, on ajoute, en amont de la méthionine, deux paires de bases convenablement choisies [en général, 2 + 3n (n = 0, 1, 2, 3, ...)].

(5) On ajoute aux deux extrémités des sites *Pst*I.

On peut également ajouter, immédiatement avant le site *Pst*I, n'importe quel nombre voulu de paires de bases si cela est approprié lors de la synthèse de chacun des fragments.

(6) Finalement, on ajoute, aux deux extrémités, deux paires de bases choisies au hasard afin d'améliorer l'efficacité d'hydrolyse de l'enzyme de restriction *Pst*I.

Le gène désigné de la manière indiquée ci-dessus contient le site *Hinf* I et le site *Hae* II dans le gène de structure de la 27-désamidosécrétine.

Synthèse chimique du fragment

1) *Synthèse*

On effectue la synthèse des fragments par la méthode en phase solide décrite dans la littérature[6a]. Toutefois, on effectue l'isolation et la purification des fragments obtenus par synthèse en procédant selon le procédé amélioré décrit ci-dessous.

Les rendements de la synthèse des fragments respectifs sont indiqués dans le tableau ci-dessous:

Fragment	*Séquence des bases*	*Longueur de chaîne*	*Rendement (%)*
S-1	ACCTGCAGCCATGCAC	16	33
S-2	GCTGCAGGT	9	52
S-3	TCAGATGGTACTT	13	56
S-4	ATCTGAGTGCATG	13	42
S-5	TCACCTCAGAACTAT	15	43
S-6	GAGGTGAAAGTACC	14	47
S-7	CTCGTCTACGTGATT	15	38
S-8	AGACGAGATAGTTCT	15	27
S-9	CAGCACGCCTCCAGC	15	32
S-10	CGTGCTGAATCACGT	15	43
S-11	GCTTGCTGCAAGGT	14	22
S-12	AGCAAGCGCTGGAGG	15	44
S-13	CTCGTTTGATAGG	13	47
S-14	AAACGAGACCTTGC	14	42
S-15	voir S-2		
S-16	ACCTGCAGCCCTATC	15	32

2) *Purification*

A 50 mg de résine ayant subi la synthèse en phase solide, on ajoute 0,5 M de tétraméthylguanidine d'aldoxime α-picolinique et 100 à 200 µl d'un mélange (1:1) de dioxanne et d'eau[14] et on laisse reposer le mélange à la température ambiante pendant quelques heures. Ensuite, on ajoute au mélange 2 ml d'une solution concentrée aqueuse d'ammoniaque et on laisse reposer l'ensemble à 55°C, pendant une nuit, dans un récipient fermé hermétiquement au moyen d'un bouchon. On filtre le mélange résultant de manière à séparer la résine et on concentre le filtrat que l'on soumet ensuite à une filtration à travers un gel. On effectue l'élution au moyen de 50 mM de tampon TEAB (pH 7,5) et l'on recueille les fractions éluées dans le volume vide. On concentre ces fractions et on les introduit en «HPLC» d'une colonne en phase inversée C-18 (Waters: «Radial Pack A», diamètre 8 cm × 10 cm) de manière à effectuer l'élution dans un tampon de diacétate d'éthylène-amine 0,01M (pH 7,8) avec un gradient de concentration d'acétonitrile de 10 à 32% avec un débit de 2 ml/min pendant 16 min. On recueille les fractions éluées pendant 11 à 12 min. Au cours de cette opération, des oligonucléotides ne présentant pas de groupe trityle sont élués sous la forme d'un pic d'injection. On concentre la fraction éluée, et après y avoir ajouté 1 ml d'acide acétique à 80%, on la laisse reposer à la température ambiante pendant 15 min. On élimine, par extraction, le tritanol, on concentre la couche aqueuse et on l'applique à nouveau sur la colonne en phase inversée. On effectue l'élution, dans les mêmes conditions que précédemment, avec un gradient de concentration d'acétonitrile de 0 à 20% et on recueille les fractions éluées pendant 12 à 13 min.

Phosphorylation

On dissout chaque fragment (30 g) dans un tampon à 30 mM de Tris-HCl (pH 7,5) et on ajoute à la solution 60 Ci (19,8 pmol) d'ATP [$\gamma^{32}{}_{P}$] et 2 µl (9 unités) de polynucléotide kinase T4, de manière à porter la quantité totale à 50 µl, et l'on fait suivre cette opération par une incubation à 37°C pendant 20 min. On ajoute ensuite au mélange 10 équivalents, par rapport aux fragments, d'ATP et de polynucléotide kinase T4 (9 unités) et l'on fait suivre cette opération par une incubation à 37°C pendant 20 min. On arrête la réaction par chauffage à 100°C pendant 2 min et l'on purifie le produit par filtration sur gel. Chaque fragment est confirmé par une électrophorèse sur gel à 20%.

Ligature des fragments

On dissout chacun des $0{,}05A_{260}$ des fragments S-1, S-2, S-3, S-4 et S-6 dans un tampon (Tris-HCl 20mM, pH 7,5 $MgCl_2$ 10mM, DTT 10mM [dithiothréitol, ATP (adénosine triphosphate) 0,2mM]) de manière à constituer une solution en quantité totale de 30 µl. On ajoute à la solution 1 µl (150 unités) d'ADN ligase T4 et on laisse reposer le mélange à 10°C pendant une nuit. On confirme la réaction par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 8%. On effectue de manière similaire la synthèse des blocs B et C.

On mélange ensemble les mélange réactionnels des blocs A et B et, après addition de 3 µl d'ATP à 0,2mM et 1 µl (150 unités) d'ADN ligase T4, on laisse reposer le mélange à 10°C pendant une nuit. Après confirmation de la réaction par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 8%, on ajoute le mélange réactionnel du bloc C et on laisse la réaction s'effectuer, de manière similaire, pendant une nuit. L'avancement de la réaction est confirmé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5%.

On chauffe le mélange réactionnel à 68°C pendant 15 min, puis on le refroidit à la température ambiante. On ajoute ensuite 15 µl de NaCl 0,5M et 80 unités de l'enzyme de restriction *Pst* I, puis on laisse le mélange reposer à 37°C pendant une nuit. On arrête la réaction par chauffage à 90°C pendant 1 min et on soumet le mélange réactionnel à une séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5%. On découpe la bande ayant la plus grande longueur de chaîne et on la transfère sur une électrophorèse par un gel agarose à bas point de fusion à 1% afin d'effectuer l'extraction de la bande obtenue.

Clonage

On ajoute le plasmide pBR322 (4 g) à un mélange (quantité totale: 50 µl) de tampon Tris-HCl 100mM, $MgCl_2$ 5mM et NaCl 50mM et on effectue la réaction en utilisant 6 unités de l'enzyme de restriction *Pst* I, à 37°C pendant 2 heures. Après quoi on arrête la réaction par chauffage à 68°C, pendant 15 min. On ajoute le gène synthétique indiqué ci-dessus au mélange réactionnel et l'on effectue la réaction de ligature en procédant de manière similaire en utilisant de l'ADN ligase T4.

On effectue la transformation de la souche d'*E. coli* K12C600, en procédant selon la méthode de Kuschner[10], dans un dispositif d'enceinte du type P-3[11] en utilisant 50 µl du mélange réactionnel obtenu qui constitue l'équivalent de 0,68 µg d'ADN de pBR322.

On choisit la souche transformée sur une plaque du type L (1% Bactotripton, 0,5% extrait de Bactolevure, 0,5% NaCl, 1,5% Bactoagar) contenant 10 µg/ml de tétracycline (Tc) et l'on étudie 50 souches, parmi les souches transformées obtenues, afin de déterminer leur résistance à l'ampicilline (Ap), et l'on isole 45 souches transformées ayant les propriétés Tc^r/Ap^s. A titre de référence, on désigne ces dernières souches par la dénomination C600 (pMG 101) – C600 (pMG 145).

Parmi les souches transformées ayant les propriétés Tc^r/Ap^s, on choisit au hasard 8 souches [C600 (pMG 101) – C600 (pMG 108)] et l'on isole l'ADN du plasmide par sédimentation à l'équilibre à travers un gradient de densité de chlorure de césium contenant du bromure d'éthidium. A titre de référence, on désigne l'ADB du plasmide ainsi isolé par la dénomination pMG 101 – pMG 108.

Confirmation de la direction

On dissout le plasmide (5 g) dans un mélange (30 µl) de tampons Tris-HCl 10mM, $MgCl_2$ 66mM, β-mercaptoéthanol 6mM et NaCl 60mM et l'on ajoute à la solution 30 unités de l'enzyme de restriction *Hae* III, cette opération étant suivie par un chauffage à 37°C pendant 1 heure. On extrait des fragments de 375 bp par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion à 1,5%. On soumet à une hydrolyse, de manière similaire, les fragments ainsi extraits, en utilisant 18 unités de l'enzyme de restriction *Hae* II et l'on identifie le produit hydrolysé à 191 bp et 176 bp, comme déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5%, comme plasmide ayant la direction correcte.

Identification de la protéine fusionnée au moyen de minicellules

On transforme, au moyen des plasmides pMG 103 et pBR 322, selon la méthode de Kuschner[10], un *E. coli* produisant des minicellules (F^-, Thr^+, ara^+, Leu^+, azi^s, $tonA^s$, minA, minB, gal^+, λ^-, sfr^r, malA, xyl, mtl, thi, sup^-) de façon à obtenir un produit de transformation ayant les propriétés Tc^r/Ap^s.

On effectue une préculture du produit de transformation dans 20 ml de milieu de culture minimum de Davis contenant 0,5% de casamino acide, thymine (20 µg/ml), thiamine (2 µg/ml) et tétracycline (10 µg/ml) à 37°C pendant 16 heures et, après inoculation de 10 ml de la préculture dans 50 ml du même milieu (mais ne contenant pas de tétracycline), on effectue la culture jusqu'à OD_{620} = 0,6-0,8. On soumet le bouillon de culture à une centrifugation, au moyen d'une centrifugeuse refroidie de marque HITACHI (modèle RPR-9, à 3000 tours par min) pendant 12 min, afin de séparer les cellules-hôtes et, ensuite, à une centrifugation à 8500 tours/min pendant 25 min, de façon à obtenir des granules de minicellules. On lave les granules de minicellules en les suspendant dans 25 ml de tampon To (1M Tris-HCl pH 7,3, 150 mg $MgSO_4$, $7H_2O$, 1 ml gélatine à 1%, $CaCl_2$ 1M 0,25 ml/l-H_2O). On soumet la suspension à une centrifugation à 10 000 tours/min (dans un rotor du type RPR-20), pendant 15 min, et l'on suspend, dans 1 ml de tampon T1, le précipité de minicellules résultant. On soumet la suspension ainsi obtenue à une centrifugation dans un gradient de densité par paliers de 10% - 15% - 20% (à 4000 tours/min, dans un rotor du type RPRS-4, pendant 25 min) de manière à récupérer les minicellules. On suspend ensuite la suspension de minicellules dans 20 ml de tampons T1 et l'on répète les opérations similaires.

On suspend les minicellules dans 1 ml de milieu de culture minimum de Davis, contenant chacun des 18 acides aminés suivants (alanine, valine, isoleucine, proline, phénylalanine, tryptophane, glycine, sérine, thréonine, cystine, tyrosine, asparagine, acide aspartique, glutamine, acide glutamique, lysine, arginine, histidine) en concentration finale de 50 µg/ml pour chacun de ces acides, 20 µg/ml de thymine et 2 µg/ml de thiamine et l'on chauffe sous agitation à 37°C pendant 12 min. On chauffe encore le mélange pendant 10 min après adjonction à la suspension de 20 Ci(S^{35})-méthionine (NEN (New England Nuclear): 1260,1 Ci/mmol) et 5 µCi(H^3)-leucine (NEN: 115,2 Ci/mmol). Immédiatement après, on ajoute au mélange le même tampon contenant 50mM NaN_3, 100 µg/ml de méthionine et 100 µg/ml de leucine. On effectue ensuite une centrifugation à 3000 tours/min, pendant 20 min, de façon à récupérer les minicellules que l'on suspend à leur tour dans 20 µl d'un échantillon de tampon [H_2O 6 ml, 1, 25M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml, 0,4 g SDS (dodécylsulfate de sodium), 2 ml glycérol, 1 ml 2-mercaptoéthanol, 4 mg BPB (bleu de bromophénol)] et chauffe à 100°C pendant 3 min. On soumet ensuite 18 µl de cette suspension à une séparation par électrophorèse sur SDS-poly-acrylamide.

Dans les cellules d'*E. coli* K12C600 (pBR322) (FERM-P 6017), on a synthétisé la β-lactamase et une bande correspondant à un poids moléculaire d'environ 29 kilodaltons apparaît sur le gel d'électrophorèse, mais on ne détecte pas la présence d'une telle protéine d'environ 29 kilodaltons dans les extraits de cellules d'*E. coli* K12C600 (pMG 103). Au lieu de cette protéine, il apparaît un polypeptide d'environ 24 kilodaltons sous la forme d'une nouvelle bande. Il s'agit clairement du gène produit par codage par le pMG 103 en relation avec la disparition de la bande de la β-lactamase. Le pMG 103 a une structure dans laquelle une partie du gène β-lactamase du pBR322 (codant 182 acides aminés à partir de l'extrémité amino du peptide de signal de la protéine de structure de la β-lactamase) est ligaturé en aval de ce dernier (pour la transcription) au gène de la 27-désamidosécrétine (codant 27 acides aminés), et son gène résultant peut être détecté en tant que protéine fusionnée du fragment de β-lactamase (182 acides aminés) - 27-désamidosécrétine (27 acides aminés). La valeur calculée pour le poids moléculaire du produit fusionné est de 23,4 kilodaltons et l'on peut donc considérer que la nouvelle bande qui apparaît dans les extraits d'*E. coli* K12C600 (pMG 103) correspond à cette protéine fusionnée.

Purification de la protéine

On soumet l'*E. coli* K12C600 (pMG 103) à une culture sous agitation dans 3 litres de bouillon de culture de Luria à 37°C et on centrifuge lorsque la concentration en micro-organismes atteint environ 1×10^9 cellules/ml. On lave les agglomérats résultants au moyen de tampon Tris-HCl 10mM (pH 8,0)/fluorure de phénylméthylsulfonyle 1mM et on effectue une nouvelle centrifugation. On remet les agglomérats en suspension dans le même tampon. On traite la suspension au moyen d'EDTA en concentration finale de 10mM, à 0°C pendant 5 min, puis on la traite au moyen de lysozyme de blanc d'œuf, de concentration finale 0,1 mg/ml, à 0°C pendant 30 min, de manière à effectuer la formation-lyse du sphéroplaste. On traite le produit résultant au moyen d'un dispositif générateur d'ultrasons, de marque Kubota, modèle «Insonator 200 M», à la puissance maximale (200 W) pendant 10 min, de manière à détruire complètement les cellules bactériennes. Cette opération est suivie par une séparation par centrifugation (en utilisant une centrifugeuse refroidie de marque HITACHI, modèle 20 PR52, avec un rotor RPR 20-2, à 18000 tours/min pendant 30 min, à 0°C) de manière à éliminer les débris de cellules. On ajoute à la partie surnageante obtenue (110 ml) du chlorure de magnésium en concentration finale de 50mM, puis on soumet le mélange à une centrifugation (au moyen du rotor indiqué ci-dessus, à 8000 tours/min, pendant 10 min, à 0°C). A la partie surnageante, on ajoute 400 µg de DNase I et 5 mg de RNase I de façon à effectuer un traitement à 4°C pendant 1 heure, après quoi on sépare les protéines et les peptides par salification au moyen d'une solution saturée à 80% de sulfate d'ammonium. On dissout, dans un tampon Tris-HCl 10mM (pH 8,0), le précipité obtenu par centrifugation (en utilisant un rotor RPR 20-2, à 8000 tours/min, pendant 10 min, à 0°C), puis on dessale au moyen du même tampon et on centrifuge dans les conditions indiquées ci-dessus. On ajoute ensuite à la partie surnageante de l'acétone en concentration finale de 75% et on traite, pendant une nuit, le précipité formé, par 1,0 g de bromure de cyanogène dans 20 ml d'acide formique à 80%. Après évaporation, on extrait le résidu par 40 ml d'isopropanol, puis au moyen d'un volume égal de méthanol. On effectue ensuite une nouvelle évaporation et on dissout le résidu dans de l'acide acétique 0,1N. Après élimination par centrifugation des parties insolubles (3000-4000 G, pendant 5 min), on effectue une filtration sur gel à travers une colonne de «Sephadex G-25» (produite par la société Pharmacia CO.) et on recueille les fractions ayant des poids moléculaires de 1000 à 10000, puis on les lyophilise.

Dosage biologique

On dose les échantillons lyophilisés ainsi obtenus par un procédé de dosage biologique[12] dans lequel on dissout l'échantillon lyopilisé dans un volume total de 2 ml d'une solution de chlorure de sodium isotonique, on injecte par voie intraveineuse dans l'aine des parties aliquotes respectives de 0,25 ml à 5 rats, on mesure les quantités de suc pancréatique sécrété à travers un tube pancréatique artificiel, à des intervalles de 10 min, et l'on détermine l'augmentation de quantité de la sécrétion en tant qu'activité biologique de la sécrétine. Comme sécrétine de référence, on injecte auparavant, par voie intraveineuse, au même rat, du Secrepan (Eisai, Japon) en quantités de 0,25 U/kg et 0,50 U/kg et l'on mesure les quantités de suc pancréatique sécrété, afin de déterminer la correspondance avec les unités Eisai (qui sont pratiquement égales à l'unité de Crick Harper Raper). On constate que les échantillons obtenus à patir d'*E. coli* K12C600 (pMG 103) provoquent une augmentation de la sécrétion du suc pancréatique de 202% ± 76 (moyenne ± déviation standard), 10 min après injection, et de 180% ± 87,6 20 min après l'injection. D'autre part, le Secrepan provoque une augmentation de 162% ± 28 et 206% ± 58, respectivement après 10 min et 20 min dans le cas d'une injection de 0,25 U/kg et de 159,8% ± 83,7 et 250,8% ± 216,5, respectivement 10 min et 20 min après injection d'une dose de 0,5 U/kg. Ces valeurs, qui constituent le résultat d'un essai du type t, révèlent une différence notable pour $p < 0,05$. D'autre part, lorsque l'échantillon obtenu en partant des extraits des cellules bactériennes obtenus à partir du clone ne contenant que le pBR322 et ne contenant pas de gène de la désamidosécrétine a été soumis à l'essai par le même procédé, on n'observe pas d'augmentation de la quantité du suc pancréatique sécrété. Cela indique qu'une substance ayant une activité biologique similaire à celle de la sécrétine est poduite par les cellules d'*E. coli* K12C600 (pMG 103) alors qu'une telle substance n'est pas produite dans les cellules d'*E. coli* K12C600 (pBR 322). En reportant l'augmentation de la quantité de suc pancréatique sécrété par les échantillons obtenus à partir d'*E. coli* K12C600 (pMG 103) sur une droite obtenue en reportant les points sur un graphique en échelle semi-logarithmique, l'augmentation de la quantité de suc pancréatique sécrété étant portée en ordonnées et les unités Secrepan en abscisses (échelle logarithmique), on peut déterminer l'unité sécrétine par la méthode d'extrapolation (à condition d'obtenir une relation linéaire), la valeur ainsi obtenue étant de 0,17 à 0,24 unité Eisai (correspondant à 0,17 à 0,24 unité Crick Harper Raper)/0,25 ml/kg de rats. Lorsque l'on effectue le calcul en tenant compte des poids corporels des rats utilisés, cette valeur est étalonnée de 0,051 à 0,072 U/0,25 ml/rat, l'activité totale s'élevant à 0,408 à 0,576 U pour la quantité totale de 2 ml. Du fait que l'on sait[13] que la sécrétine purifiée ayant le plus grand degré de pureté à une activité spécifique de 16000 unités CHR/mg, les valeurs de 0,408 à 0,576 U correspondent à une quantité de 25,5 à 36 ng de sécrétine. Cela correspond à 7,15 à 10,1 pmol molécules de sécrétine, ce qui indique que l'on a effectué la synthèse biologique d'une désamidosécrétine ayant une activité correspondant à 4,3 à 6,1 $\times 10^{12}$ molécules de sécrétine. Du fait que la désamidosécrétine est préparée

en utilisant environ 3 × 10^{12} cellules d'*E. coli* K12C600 (pMG 103) comme produit de départ, on récupère au moins 1,4 à 2,0 équivalent moléculaire de sécrétine par cellule de bactérie.

Dosage radio-immunologique

On dilue l'échantillon dans un mélange de tampon Tris-HCl 50mM (pH 8,0) et albumine de sérum bovin à 0,1%. On effectue le dosage radio-immunologique de l'échantillon dilué en utilisant un ensemble de dosage «Secretin kit Daiichi» produit par la société japonaise Daiichi Radioisotope Research Institute, en suivant le procédé indiqué, de manière à confirmer l'activité de l'échantillon.

Exemple 2:

On effectue les opérations de ligature entre les fragments en procédant de manière similaire à celle qui est décrite dans l'exemple 1.

Préparation de l'ADN du λplac5 et de l'ADN du pBR322

L'ADN du λplac5 est obtenu à partir de bactéries lysogéniques *E. Coli* PK 1512 (IFO 14149), le mode de préparation suivi correspondant à la méthode d'Oshima[20].

L'ADN du pBR322 est obtenu à partir d'*E. Coli* K-12 C600 (pBR322) (FERM-P 6017) en procédant conformément à la méthode de M. Kahn et al.[21].

Préparation du pREI

On ajoute 10 λg d'ADN de λplac5 à un mélange (en quantité totale égale à 20 µl) de tampon Tris-HCl 100mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 7mM et NaCl 50mM, et on effectue la réaction en utilisant 10 unités de l'enzyme de restriction *Eco*RI et 10 unités de l'enzyme de restriction *Hind* III à 37°C, pendant 2 heures. On purifie ensuite, par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, des fragments d'ADN de 3,8 mégadaltons.

On ajoute 1 µ d'ADN de pBR322 à un mélange (en quantité totale égale à 10 µ) semblable à celui qui est indiqué ci-dessus et l'on effectue la réaction en utilisant une unité de l'enzyme de restriction *Eco*RI et une unité de l'enzyme de restriction *Hind* III, à 37°C, pendant 2 heures. Après quoi on purifie, par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, des fragments d'ADN de 2,6 mégadaltons.

On ajoute les fragments ainsi obtenus à un mélange (quantité totale: 10 µl) de tampon Tris-HCl 50mM (pH 7,8), $MgCl_2$ 10mM, DTT 20mM et ATP 1mM, et l'on effectue la réaction en utilisant 30 unités d'ADN ligase T4 à 14°C, pendant 24 heures.

On effectue, en utilisant le mélange réactionnel, la transformation de la souche XA 35 d'*E. coli*, conformément à la méthode de Kuschner[10], dans un dispositif d'enceinte du type p-1[11].

On choisit la souche transformée sur une plaque du type L (Bactotrypton 1%, extrait de bactolevure 0,5%, NaCl 0,5%, Bactoagar 1,5%) contenant de l'Ap (20 µg/ml) et l'on réplique les souches transformées obtenues sur une plaque de EMB-lac (bouillon de culture de Bacto-EMB 2,25%, Bactoagar 1,5%). On choisit en outre les souches transformées en Lac^+ (colonie rouge). Parmi ces souches, on en choisit 5 au hasard pour préparer un plasmide que l'on analyse avec différentes sortes d'enzymes de restriction, ce qui permet de constater que les quatre souches consistent en fragments de 3,8 mégadaltons d'ADN de λplac5 ligaturées avec des fragments *Eco*RI - *Hind* III d'ADN de pBR 322. On désigne l'une de ces souches par la dénomination *E. coli* XA 35 (pREI). Cela signifie que la souche transformée *E. coli* XA 35 (pREI) est différente de la souche XA 35 d'*E. coli*, indiquée plus haut en ce qui concerne les propriétés suivantes:

Ap^r, Lac^+

Séquence de liaison

On effectue la synthèse d'un fragment ayant la séquence de base CTGAATTCAGCTCTGCAGAG. On effectue la synthèse et la purification conformément au procédé de synthèse et purification des gènes de structure respectifs comme décrit ci-dessus (rendement: 40%). On désigne l'ADN simple-brin ainsi obtenu par le terme de «séquence de préliaison».

La séquence de préliaison (15 µg) est mise à incuber en présence de 20 unités de polynucléotide kinase T4 à 37°C, pendant 40 min, dans un mélange (quantité totale: 30 µl) de tampon Tris-HCl 50mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 10mM, spermidine 0,1mM, EDTA 0,1mM, DTT 10mM et ATP 0,2mM. On arrête la réaction par chauffage à 60°C pendant 2 min. Après avoir laissé reposer le mélange à la température ambiante pendant 1 heure, on ajoute 300 unités, 1 µl, d'ADN ligase et on effectue la réaction à 14°C pendant une nuit. On arrête la réaction par chauffage à 60°C pendant 2 min. On laisse reposer le mélange à la température ambiante pendant 1 heure et on ajoute 20 unités d'enzyme de restriction *Pst* I de manière à effectuer la réaction pendant 5 heures. On arrête la réaction par chauffage à 60°C pendant 2 min.

On obtient ainsi 15 µg de la séquence de liaision *Pst* I-*Eco*RI-*Pst*I.

Préparation du gène de structure EcoRi-EcoRI

On prépare la séquence de liaison Pst I-EcoRI-PSTI comme décrit ci-dessus (4 µg) et on ajoute le gène de structure PstI-PstI mentionné dans l'exemple 1 (0,6 µg) à un mélange (quantité totale: 35 µl) de tampon Tris-HCl 100mM, pH 7,5 $MgCl_2$ 7mM et NaCl 50mM, et on effectue la réaction en utilisant 300 unités d'ADN ligase T4, à 14°C, pendant 24 heures.

On arrête ensuite la réaction par chauffage à 68°C pendant 10 min et l'on refroidit progressivement le mélange réactionnel.

On ajoute au mélange réactionnel ainsi obtenu l'enzyme de restriction *Eco*RI (100 unités) de manière à effectuer la réaction à 37°C pendant 5 heures, puis on purifie le fragment d'ADN ayant 120 paires de bases, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5%.

Préparation du pLS et clonage

On ajoute 0,25 µg de pREl à un mélange (quantité totale: 4 µl) de tampon Tris-HCl 100mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 7mM et NaCl 50mM et l'on effectue la réaction en utilisant une unité de l'enzyme de restriction *Eco*RI à 37°C, pendant 1 heure.

On ajoute le plasmide pRE 1 (coupé par EcoRl) ainsi préparé (0,25 µg) ainsi que 0,02 µg du gène de structure EcoRl-EcoRl à un mélange (quantité totale: 10 µl) de tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,8, $MgCl_2$ 10mM, DTT 20mM, ATP 1mM et l'on effectue la réaction en utilisant 30 unités d'ADN ligase T4, à 14°C, pendant 24 heures.

On transforme, en utilisant le mélang réactionnel ainsi obtenu, la souche XA 35 d'*E. coli* par la méthode de Kuschner[10] dans un dispositif d'enceinte P-3.

On choisit la souche transformée sur une plaque de type L contenant Ap (20 µg/ml) comme décrit ci-dessus. On réplique les souches transformées obtenues sur la plaque EMB-lac, en procédant comme décrit ci-dessus, en vue d'effectuer la sélection ultérieure de la souche Lac^+. Parmi ces souches, on en choisit 200 pour préparer l'ADN de plasmide dont on analyse la structure au moyen de l'enzyme de restriction *Pst* I ou *Hae* II, ce qui permet de confirmer que 11 souches présentent le gène de structure indiqué plus haut.

Détermination de la direction

On effectue ces expériences suivantes sur chacun des plasmides des 11 souches présentant le gène de structure.

On ajoute le plasmide (20 µg) à un mélange (quantité totale: 20 µl) de tampon Tris-HCl 10mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 66mM et NaCl 60mM et l'on ajoute encore à la solution 20 unités d'enzyme de restriction *Hae* 11. On effectue l'incubation à 37°C pendant 2 heures. A partir du mélange ainsi obtenu on extrait, par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, des fragments d'environ 1 mégadalton et des fragments d'environ 0,7 mégadalton. On coupe les fragments respectifs au moyen de l'enzyme de restriction *Eco*RI, en procédant de la manière décrite plus haut, et on les soumet à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15%. On identifie le plasmide dans lequel, par électrophorèse, on obtient des fragments d'ADN ayant 40 paires de bases à partir du fragment d'environ 1 mégadalton et du fragment d'ADN ayant 80 paires de bases, obtenu à partir du fragment

d'environ 0,7 mégadalton, comme étant le plasmide dans lequel le gène de structure est inséré dans la direction correcte.

Ces expériences permettent de déduire que 5 des souches de plasmide parmi les 11 souches présentant le gène de structure ont la direction correcte. On choisit au hasard l'une de ces souches et on la désigne par la dénomination *E. coli* XA 35 (pLS 58).

Identification et purification de la protéine fusionnée

On soumet l'*E. coli* XA 35 (pLS 58) à une culture sous agitation dans 1 litre de bouillon Luria contenant 20 µg/ml d'ampicilline, à 37°C, jusqu'à ce que le nombre de bactéries atteigne 5×10^8 cellules/ml. On prélève alors les cellules de bactérie par centrifugation et on les suspend dans un mélange (quantité totale: 100 ml) de tampon Tris-HCl 10mM (pH 7,5) et $MgCl_2$ 10mM et l'on traite la suspension en utiliant un appareil générateur d'ultrasons de marque Kubota, modèle «Insonator 200 M», pendant 30 minutes, de manière à détruire les cellules de bactérie.

On soumet la solution ainsi obtenue (2 µl) à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS 7,5%, ce qui permet d'observer une bande de protéine correspondant à 120 000 daltons. On n'observe pas de bande de ce genre dans l'extrait obtenu de manière similaire à partir des bactéries n'ayant pas de plasmide (souche XA 35 d'*E. coli*). On considère par conséquent que cette protéine est dérivée du plasmide pLS 58.

On confirme également que la protéine a pratiquement la même dimension que celle de la β-galactosidase[19] obtenue à partir d'*E. coli*, ce qui n'est pas en contradiction avec les dimensions (117 173 daltons) de la protéine fusionnée de désamidosécrétine et β-galactosidase.

On en conclut donc que cette protéine d'environ 120000 daltons constitue la protéine fusionnée et l'on procède à la purification de cette protéine.

On soumet à une centrifugation l'extrait obtenu par destruction aux ultrasons et l'on récupère le précipité. On récupère substantiellement la protéine fusionnée dans le précipité. On suspend le précipité dans un mélange (quantité totale: 100 ml) de tampon Tris-HCl (10mM pH 7,5) et $MgCl_2$ 1mM et on le soumet à une centrifugation suivie par la récupération du précipité. On répète cette opération à deux reprises afin d'éliminer les parties solubles dans l'eau.

On dissout le précipité obtenu dans un mélange (quantité totale: 100 ml) de tampon Tris-HCl 20mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 1mM, NaCl 10mM et urée 7M, et on le fait passer dans une colonne (diamètre: 5 cm × 3 cm) de cellulose DEAE équilibrée par le même tampon.

Après lavage au moyen de 20 ml du même tampon, on lave encore la colonne par 100 ml d'un tampon similaire dans lequel la concentration en NaCl est modifiée de manière à prendre la valeur 50mM. On élue ensuite la protéine fusionnée au moyen de 150 ml d'un tampon similaire dans lequel la concentration en NaCl est modifiée de façon à prendre la valeur 150mM.

On ajoute au produit d'élution ainsi obtenu du β-mercaptoéthanol en concentration finale de 1% et on dialyse 3 fois le mélange contre 5 litres d'eau. On centrifuge le produit de dialyse de façon à récupérer la protéine fusionnée en tant que précipité.

La protéine fusionnée ainsi obtenue produit une bande pratiquement unique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS, en quantité d'environ 28 mg par litre de bouillon de culture, calculée d'après l'absorption à 280 nm. On calcule que cette valeur correspond à environ 280 000 molécules/cellule.

On dissout la protéine fuisonnée purifiée dans 2 ml d'acide formique à 70% et on la traite par 100 mg de bromure de cyanogène, pendant 18 heures. Après évaporation, on extrait le résidu par 5 ml d'isopropanol, puis par 5 ml de méthanol, et l'on fait suivre cette extraction par une lyophilisation.

Dosage biologique

On procède, par la méthode de dosage biologique[12], au dosage de l'échantillon lyophilisé en dissolvant celui-ci dans un volume total de 25 ml de solution isotonique de chlorure de sodium, on injecte à 5 rats, par voie intraveineuse dans l'aine, des parties aliquotes de 50 µl chacune, on mesure les quantités de suc pancréatique sécrété et s'écoulant par un tube pancréatique artificiel, à des intervalles de 5 min et on note l'augmentation de l'écoulement en tant qu'activité biologique de la sécrétine. Comme sécrétine de référence, on injecte au préalable par voie intraveineuse, aux mêmes rats, du Secrepan (Eisai, Japon) en quantité égale à 1 unité, 2 unités et 4 unités/rat et l'on mesure les quantités de suc pancréatique sécrété afin de déterminer la correspondance entre l'unité Eisai (pratiquement égale à l'unité Crick Harper Raper).

On constate que les échantillons obtenus à partir d'*E. coli* XA 35 (pLS 58) conduisent à une augmentation de la sécrétion du suc pancréatique. D'autre part, lorsque l'on dose, suivant la même méthode l'échantillon obtenu à partir d'extraits de cellules de bactéries obtenues à partir du clone ne contenant que pRE1 et ne contenant pas de gène de désamidosécrétine, on n'observe pas d'augmentation de la quantité de suc pancréatique sécrété. Cela indique qu'une substance ayant une activité biologique similaire à celle de la sécrétine est produite dans les cellules d'*E. coli* XA 35 (pLS58), alors qu'il ne se produit pas de substance de ce genre dans les cellules d'*E. coli* XA 35 (pRE1).

En reportant les quantités augmentées de suc pancréatique sécrété par les échantillons obtenus à partir d'*E. coli* XA 35 (pLS 58) sur une ligne droite obtenue sur un graphique semi-logarithmique, les quantités augmentées de suc pancréatique sécrété étant portées en ordonnées et les unités Secrepan en abscisses (échelle logarithmique), on peut déterminer, par interpolation, que l'unité sécrétine est de 3 unités Eisai/50 µl/rat, ce qui correspond à environ 1500 unités Eisai sous forme de 25 ml de solution isotonique de chlorure de sodium contenant l'échantillon lyophilisé. Etant donné que l'on sait que la sécrétine purifiée au maximum a une activité spécifique de 16 000 unités CHR/mg, 1500 unités correspondent à environ 26 nmoles de molécules de sécrétine, ce qui indique que l'on a effectué la synthèse biologique d'une désamidosécrétine ayant une activité correspondant à $1,6 \times 10^{16}$ molécules de sécrétine. Du fait que la désamidosécrétine est préparée en utilisant environ 5×10^{11} cellules d'*E. coli* XA 35 (pLS 58), on récupère au moins 3×10^4 équivalents moléculaires de sécrétine par cellule de bactérie.

On peut en conclure que le gène de la 27-désamidosécrétine synthétique est exprimée par l'action du promoteur d'opéron lactose de l'*E. coli* dans les cellules d'*E. coli* XA 35 (pLS 58) et que son produit de translation, c'est-à-dire la 27-désamidosécrétine, présente une activité similaire à celle de la sécrétine.

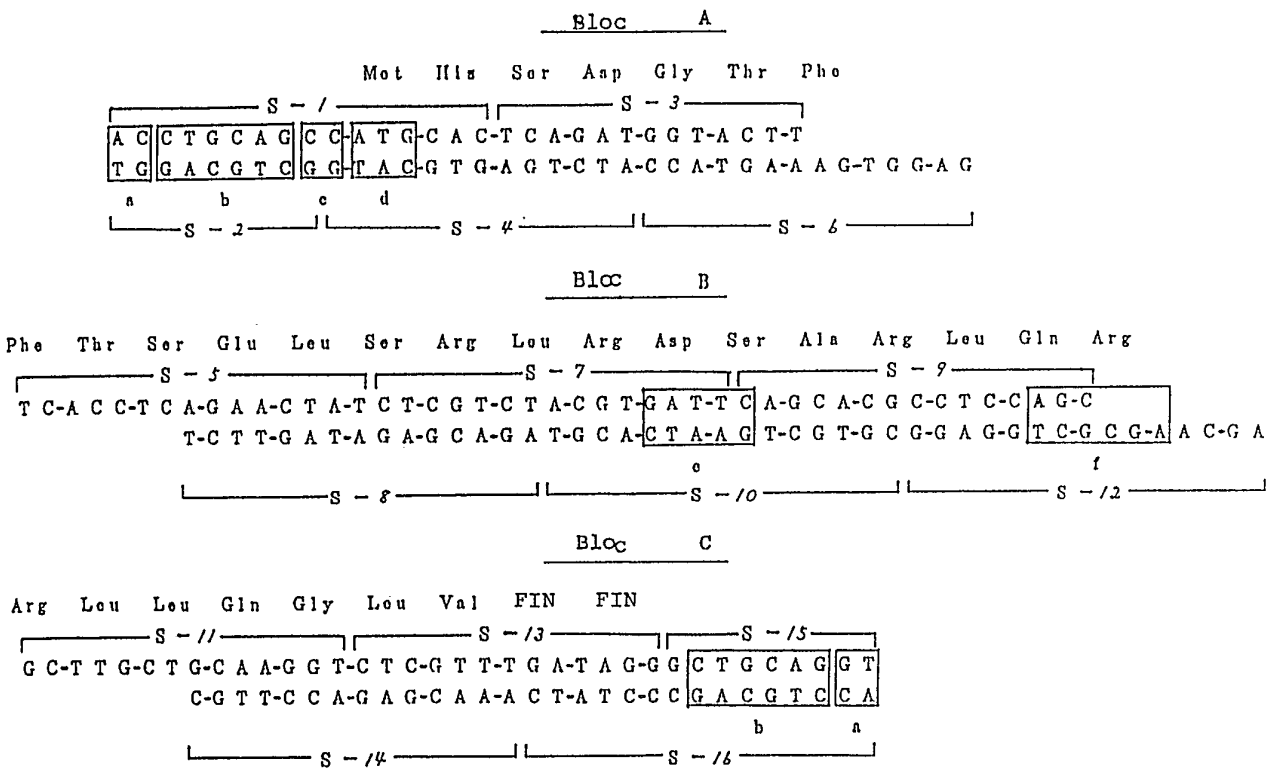
Dosage radio-immunologique

On dilue l'échantillon dans un mélange de tampon Tris-HCl 50mM (pH 8,0) et d'albumine de sérum bovin à 0,1%. On effectue le dosage radio-immunologique de l'échantillon dilué en utilisant un ensemble de doage du type «Secretin Kit Daiichi» produit par la société japonaise Daiichi Radioisotope Research Institute, en procédant de la manière prescrite, de manière à confirmer son activité.

Schéma de structure du gène

Le schéma suivant représente la séquence des bases du gène comprenant le gène de structure de la 27-désamidosécrétine sous forme de blocs séparés A, B et C, a étant une paire de bases choisie à volonté, b le site Pst I, c est une paire de bases choisie à volonté, d est un codon de départ, e est le site Hinf I, et f est le site Hae II.

SCHÉMA DE STRUCTURE DU GÈNE



Dépôt des micro-organismes

Les souches *E. coli* K12C600, *E. coli* XA 35 et son produit de transformation *E. coli* XA 35 (pRE 1) par le plasmide pRE 1 sont déposées conformément aux dispositions du Traité de Budapest sur la reconnaissance internationale des dépôts de micro-organismes en vue de la protection par brevet, auprès du Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (FERM), 1-3, Higashi 1-chome, Yatabemachi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken, Japon, sous le numéro de dépôt FERM BP-115, en date du 9 juin 1981, FERM BP-116, en date du 7 janvier 1982 et FERM BP 117, daté du 7 janvier 1982, respectivement. Le plasmide pBR 322 est déposé auprès du FERM sous forme du produit de transformation d'*E. coli* K12C600 par pBR 322, c'est-à-dire l'*E. coli* K12C600 (pBR 322), sous le numéro FERM P-6017, daté du 9 juin 1981.

L'*E. coli* K12C600 (pMG 103), qui est le produit de transformation par le plasmide chimère pMG, est déposé auprès d'American Type Culture Collection (ATCC), 12301, Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A., sous le numéro ATCC 39042, daté du 26 janvier 1982.

L'*E. coli* PK 1512, qui est la bactérie lysogénique λplac5, est déposé auprès de l'Institute for Fermentation, Juso-Hommachi, 2-17-85, Yodogawa-Ku, Osaka-Shi, Japon, sous le numéro IFO 14149, daté du 1er février 1982.

L'*E. coli* XA 35 (pLS 58), qui est le produit de transformation par le plasmide chimère, est déposé conformément aux dispositions du Traité de Budapest auprès d'ATCC,sous le numéro ATCC 39040, en date du 11 janvier 1982.

Bibliographie

1) Acta Chemica Scandinavica, 15, 1790 (1961);
2) a) Chemical industry, 1966, 1757,
   b) Journal of the American Chemical Society, 89, 6753 (1967);
3) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America, 75, 3737 (1978);
4) a) Science, 198, 1056 (1977),
   b) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75, 5765 (1978)
   c) Nature, 281, 18 (1979),
   d) Biochemistry, 1980, 6096 (1980);
5) Science, 203, 614 (1979);
6) a) Nucleic Acids Research, 8, 5491 (1980),
   b) Nucleic Acids Research, 8, 5193 (1980),
   c) Tetrahedron Letters, 21, 4159 (1980),
   d) Nucleic Acids Research, 8, 2331 (1980);
7) a) The Journal of Biological Chemistry (J. Biol. Chem.), 241, 2014 (1966),
   b) Nucleic Acids Research, 1, 1665 (1974);
8) Nucleic Acids Research, 8, 5753 (1980);
9) Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 26, 2396 (1978);
10) Genetic Engineering, 1978, 17 (1978);
11) Guidlines for Recombinant DNA Experiment, publié en août 1979;
12) The Japanese Journal of Pharmacology, 21, 325 (1971);
13) a) Chemische Berichte, 105, 2508 (1972),
   b) Chemische Berichte, 105, 2515 (1972);
14) Tetrahedron Letters, 1978, 2727 (1978);
15) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73, 3900 (1977);
16) Gene, 2, 95 (1977);
17) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76, 106 (1979);
18) The operon, 31 (1980) (par J. H. Miller, W.S. Resnikoff; publié par le Cold Spring Harbor Laboratory);
19) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 1507 (1977);
20) Volumes supplémentaires de «Protein, nucleic acid & enzyme», dernier vol., p. 19 (1973);
21) Methods in Enzymology, 68, 265 (1979);
22) Microbiological Reviews, 44, 1-50 (1980);
23) Nature, 224, 768 (1969);
24) Nature, 217, 1110 (1968).