(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 573 773**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **85 17437**

(51) Int Cl⁴ : C 12 N 15/00.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 26 novembre 1985.

(30) **Priorité :** HU, 26 novembre 1984, n° 4363/84.

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** BOPI « Brevets » n° 22 du 30 mai 1986.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *Société dite : RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR R. T., société régie par les lois en vigueur en Hongrie.* — HU.

(72) **Inventeur(s) :** Imre Boros, Pál Venetianer et Tamás Lukacsovich.

(73) **Titulaire(s) :**

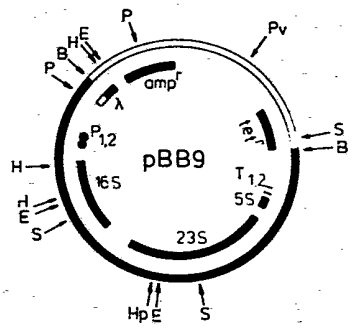
(74) **Mandataire(s) :** Cabinet Ores.

(54) Vecteurs de réplication et leur procédé de production.

(57) La présente invention est relative à des vecteurs de réplication.

Ces vecteurs de réplication pour la production de protéines dans des cellules de E. coli contiennent un opéron hybride, qui comprend des parties d'un opéron de rARN de E. coli et une partie d'un opéron codant pour une protéine.

Ces vecteurs de réplication assurent une réplication d'un gène étranger sous le contrôle d'un opéron hybride.



FR 2 573 773 - A1

La présente invention est relative à des vecteurs de réplication. Plus particulièrement, elle concerne des vecteurs de réplication assurant une réplication d'un gêne étranger sous le contrôle d'un opéron hybride qui combine des parties d'opéron de rARN de E. coli et une partie d'un opéron codant pour une protéine. De plus, l'invention est relative à la production de ces vecteurs de réplication. Le procédé de construction des vecteurs de réplication conforme à la présente invention comprend : l'élimination de la majorité de la partie structurale d'un opéron de rARN de E. coli porté par un plasmide convenable pour obtenir un opéron de rARN raccourci, la combinaison de cet opéron de rARN raccourci avec une partie d'un opéron codant pour une protéine pour produire une région hybride efficace de contrôle de la réplication et enfin, l'insertion d'un fragment d'ADN codant pour un polypeptide désiré dans l'opéron combiné, pour assurer une réplication des gênes sous le contrôle de la région hybride de contrôle de la réplication.

Les techniques de l'ADN recombinant ont rendu possible l'introduction d'ADN provenant d'une source quelconque, dans des cellules bactériennes. L'entretien stable d'un gêne étranger dans des cellules bactériennes et la réplication de l'information génétique codée, peuvent être assurés par des molécules spécifiques de support, dénommées vecteurs de réplication. Dans des cellules bactériennes, un gêne codant pour une protéine est répliqué par une série complexe de réactions impliquant une transcription de l'ADN en ARN et la traduction ultérieure de l'ARN en protéine. Ces deux processus complexes sont effectués et contrôlés par des protéines bactériennes spécifiques, qui reconnaissent des sections de contrôle ou de signal de la réplication, situées en tête de la section codante. Comme les structures de ces sections de signal diffèrent pour des gênes de différents organismes, des sections de signal de réplication de procaryote étranger et d'eucaryote sont médiocrement reconnus

par des enzymes bactériennes. Ainsi, pour assurer une réplication efficace d'un gêne étranger dans un nouvel hôte, le morceau d'ADN codant pour la protéine désirée doit être lié à une section de signal de réplication endogêne, qui dirige une transcription et une traduction efficaces. De plus, comme une sur-production d'un gêne étranger peut être nuisible pour les cellules-hôtes et peut conduire à une stabilité réduite de la molécule recombinante, il est souhaitable d'utiliser des sections contrôlables de signal de réplication, qui permettent la modulation de la réplication génétique pendant le développement bactérien. Ainsi, un bon vecteur de réplication qui convient pour produire directement et efficacement des protéines dans des cellules de E. coli doit être caractérisé en ce que :

1. il a un puissant promoteur de E. coli qui fournit un taux de transcription élevé ;

2. il porte un site convenable de fixation du ribosome à une distance convenable de ce promoteur pour assurer une initiation correcte et efficace de la traduction et,

3. il permet la régulation de la réplication génétique à ce taux de transcription.

Dans le cas des vecteurs de réplication pER qui sont décrits dans cette invention, les propriétés avantageuses mentionnées ci-dessus sont fournies par une région hybride de contrôle de la réplication dans laquelle sont combinées des parties d'un opéron de rARN de E. coli et des parties d'un opéron codant pour une protéine.

Toutes les cellules bactériennes vivantes synthétisent un grand nombre de ribosomes. Les composants protéiniques et ARN de ceux-ci sont codés par un ADN. Les produits finaux de la transcription des opérons de rARN sont trois espèces de rARN. Ces rARN sont non seulement plus stables que les mARN, mais ils sont aussi synthétisés en une quantité bien plus élevée dans une cellule qui se développe,

que l'un quelconque des ARN codant pour la protéine. Les opérons d'ARN ribosomaux contiennent les gênes des bactéries qui sont le plus activement transcrits. Bien qu'ils ne constituent qu'environ 0,8 % du génome, plus de 50 % de la totalité des transcriptions ont lieu sur ceux-ci dans des cellules qui se développent de façon exponentielle. La vitesse élevée de la synthèse de rARN est fournie par des sections spécifiques d'ADN, c'est-à-dire des promoteurs précédant les gênes de rARN qui dirigent la fixation de l'ARN polymérase et l'initiation de la transcription. On connaît la séquence des nucléotides de ces promoteurs et on pense qu'ils sont constitutifs, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas sous le contrôle des répresseurs, si bien que dans la cellule qui se développe, ils initient en continu la réplication des gênes qui leur sont reliés.

Les structures et le fonctionnement de nombreux opérons bactériens codant pour une protéine sont aussi bien connus et certains de ceux-ci sont souvent utilisés pour la réplication de gêne étranger dans E. coli (par exemple, lac, gal, trp). Le contrôle de la réplication de ces opérons fonctionne selon un principe similaire : la présence ou l'absence d'une petite molécule détermine le blocage de la transcription ou l'initiation de celle-ci sur le promoteur et son déroulement par la région régulatrice dans les gênes de structure de l'opéron. En conséquence, on pourrait réguler la transcription de ces opérons en ajoutant ou en retirant du milieu, les petites molécules appropriées.

La présente invention repose sur les constatations de la Demanderesse selon lesquelles les promoteurs des opérons de rARN sont capables de diriger la synthèse des protéines lorsqu'ils sont combinés avec une partie d'un opéron codant pour une protéine qui assure l'initiation de la traduction en produisant une région hybride de contrôle de la réplication, le promoteur d'un opéron de rARN en tant que partie de cette région hybride de contrôle de réplica-

tion conserve ses propriétés avantageuses concernant l'aptitude à initier la transcription avec une vitesse élevée et enfin, la région hybride de contrôle de réplication peut être contrôlée dans la mesure où elle est dans cet opéron codant pour la protéine à partir duquel elle a été construite.

Pour construire des vecteurs de réplication ayant des sections de contrôle de réplication qui satisfont aux critères ci-dessus, il est nécessaire de cloner les puissants promoteurs de rARN sous une forme stable sur un plasmide multiréplicateur. On sait que des clones recombinants contenant des promoteurs puissants sont instables, vraisemblablement parce que la transcription efficace initiée par ces promoteurs interfère avec la réplication du plasmide ou épuise la machinerie de transcription de la cellule. Pour éviter cette possibilité, la Demanderesse a créé de longues "excisions" (résultant de l'élimination de longues sections), dans l'opéron de rARN, en supprimant la majorité de la partie structurale codant pour le rARN et en réunissant directement les régions du promoteur et de la terminaison. Des plasmides portant cet opéron de rARN raccourci se révelèrent stables et ont permis la modification ultérieure de la région promoteur. Conformément à ces considérations, les principales caractéristiques de la réplication génétique assurée par les vecteurs de réplication construits selon la présente invention, peuvent être ainsi résumées :

- La transcription du gêne inséré est fournie par une région hybride de contrôle de la réplication, dans laquelle sont combinées des parties d'un opéron de rARN de E. coli et une partie d'un opéron codant pour une protéine.
- La terminaison de la transcription a lieu dans la région de terminaison de l'opéron de rARN, si bien que la transcription n'interfère pas avec la réplication du plasmide.
- La transcription est contrôlable et la réplication du

gêne inséré peut être induite ou réprimée par la même méthode qui caractérise le gêne codant pour une protéine impliqué dans l'opéron.

- Le résultat de la transcription est un ARN hybride qui comprend trois régions d'origine différente : la première correspond au gêne codant pour une protéine qui a été utilisé pour construire la région hybride de régulation, le deuxième code pour la protéine désirée et la troisième correspond à un morceau d'ADN codant pour le rARN. La présence de nucléotides correspondant au rARN mature, augmente la stabilité de l'ARN hybride.

- La traduction fournit un polypeptide fusionné ayant un fragment C-terminal codé par le gêne étranger inséré et un fragment N-terminal codé par le morceau de l'opéron codant pour une protéine qui a été utilisé pour construire la région hybride de contrôle. Ce dernier peut augmenter la stabilité de la protéine fusionnée et, dans le cas où il s'agit d'une protéine titrable, on pourrait l'utiliser pour suivre la réplication du gêne inséré.

Conformément à la présente invention, il est avantageux de produire des vecteurs de réplication satisfaisant aux critères ci-dessus et ayant également :

- le site de fixation du ribosome à une distance optimale du site de départ de la transcription pour fournir un taux élevé d'initiation de la traduction,
- un bas poids moléculaire,
- un gêne de résitance à l'ampicilline,
- des sites uniques de coupure par des endonucléases de restriction pour permettre une insertion d'un gêne étranger dans tous les trois cadres de lecture possibles.

A titre d'exemple, la Demanderesse va maintenant décrire la construction d'une série de plasmides et leur utilisation conformément à la présente invention. Les exem-

ples (décrits en détail ci-après) impliquent :

ler exemple : - l'insertion d'un opéron de rARN contenant un fragment d'ADN dans un vecteur constitué par un plasmide à taux de réplication élevé,

- l'élimination in vitro ou "excision" de la majorité de la partie structurale de cet opéron de rARN cloné pour produire un opéron de rARN raccourci avec des régions du promoteur et de la terminaison intactes,
- l'élimination in vitro ou excision de la partie qui n'est pas nécessaire du vecteur constitué par un plasmide, pour obtenir un petit plasmide recombinant pour une étude ultérieure,
- l'insertion de la première partie de l'opéron lac de E. coli dans l'opéron rrnB raccourci,
- la construction d'une région de contrôle de réplication la plus efficace possible par la modification de la distance entre les sites de départ de transcription et de traduction,
- la construction de sites de restriction uniques en aval de la région de contrôle de réplication pour obtenir des plasmides qui permettent une insertion d'ADN étranger dans tous les trois cadres de lecture possibles.

2ème exemple : - l'insertion d'un gêne procaryote dans des vecteurs de réplication produits de la façon qui est décrite ci-dessus,

3ème exemple : - l'insertion d'un gêne eucaryote dans des vecteurs de réplication produits de la façon qui est décrite ci-dessus.

Les plasmides obtenus par ce procédé et dénommés ici plasmides pER, peuvent être caractérisés en ce qu'ils ont une région hybride de contrôle de réplication pour diriger la réplication du gêne étranger, qui comprend la région promoteur et la région de terminaison de l'opéron rrnB de E. coli et la première partie de l'opéron lac de E. coli, ainsi qu'également une région qui fournit une réplication de type ColEl, un gêne codant pour la résistance à l'ampicilline, des sites de restriction uniques par des enzymes EcoRI et ClaI permettant l'insertion d'ADN étranger dans tous les trois cadres de lecture et des sites HindIII, BamHI, BglII, XbaI et PvuII, un cadre de lecture.

L'invention sera décrite en détail par les exemples non limitatifs suivants.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de mise en oeuvre sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1

Un opéron de rARN de E. coli peut être isolé à partir d'une source d'ADN qui peut être en ADN total de E. coli ou l'un quelconque de ces ADN de bactériophages transducteurs qui portent l'un de ces opérons. L'insertion de fragments d'ADN contenant l'opéron de rARN dans l'ADN du vecteur approprié a pû être réalisée selon les méthodes qui sont décrites pour l'isolation de l'opéron rrnB à partir de l'ADN du bactériophage λrif (A. Kiss et Coll., Cloning of an E. coli ribosomal RNA gene and its promoter region

from λrif^{d}18. Gene 4, 137-152, 1978) ou bien à partir de l'ADN total de E. coli (I. Boros et Coll., Physical map of the seven ribosomal RNA genes of Escherichia coli, Nucl. Acids Res. 6, 1817-1830, 1979). La première étape de construction des plasmides pER décrits dans cette invention a compris la construction du plasmide pBB9 (figure 1). Pour obtenir ce plasmide, un fragment 7,5 kb de l'ADN de λrif digéré par BamH contenant l'opéron rrnB, a été inséré dans le site BamHI du vecteur pBR322 bien connu (J.G. Sutcliffe, Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43,77-90, 1978). Le fragment inséré porte l'opéron rrnB complet de E. coli. Il contient une portion d'environ 400 bp provenant de l'ADN du bactériophage, une section de 1721 nucléotides correspondant à la région située en face du gêne de rARN 16S, les trois gênes codant pour les rARN 16S, 23S et 5S et la région de terminaison de l'opéron rrnB qui est suivie d'une section d'environ 500 nucléotides provenant d'un opéron non identifié situé au-delà de l'opéron rrnB. La région située en face du gêne de rARN 16S implique les deux promoteurs de l'opéron de rARN (désignés par P_1 et P_2) qui sont situés approximativement 180 et 300 bp en amont du gêne de rARN 16S. Des plasmides recombinants contenant un opéron complet de rARN sont instables en général. Ce comportement peut être expliqué en supposant que la transcription très intense sur le long opéron dirigée par de puissants promoteurs, épuise la machinerie de transcription de la cellule hôte. Il en résulte que ces plasmides peuvent être stabilisés par un raccourcissement de la région transcrite. La Demanderesse a donc introduit de longues excisions ("délétions") dans l'opéron de rARN cloné pour obtenir des plasmides stables, avec des régions intactes du promoteur et de terminaison. Elle a cherché à éliminer toutes les parties de l'opéron rrnB que l'on suppose ne pas être essentielles pour la construction des vecteurs de réplication désirés.

Le plasmide pBB9 a été coupé par HpaI au site unique situé dans le milieu de l'opéron rrnB et les molécules linéaires résultantes ont été traitées avec la nucléase BAL 31. Cette enzyme dégrade les chaînes polynucléotidiques à partir des deux extrémités et produit des molécules raccourcies. L'ADN digéré par BAL 31 a ensuite été traité avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase en présence des quatre dNTP pour produire des fragments d'ADN à extrémités modifiées pour être rendues cohésives et il a été soudé dans des conditions permettant la mise sous forme circulaire. L'ADN soudé a été transformé en cellules HB101 de E. coli et des colonies résistant à l'ampicilline ont été sélectionnées. Des ADN de plasmide ont été préparés à partir d'un certain nombre de colonies qui ont été cultivées sur les plaques de transformation et ils ont été utilisés pour déterminer l'importance des excisions. Pour ce faire, les ADN purifiés de plasmide ont été digérés par des endonucléases de restriction appropriées et les modèles des fragments analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

D'après la carte de restriction, la Demanderesse a choisi d'effectuer de longues excisions en commençant dans la première région du gêne d'ARN 16S et en finissant un peu en avant du gêne d'ARN 5S. Un tel plasmide résultant de cette excision a été choisi pour une étude ultérieure et dénommé pBB9Δ9. Sa structure est représentée dans la figure 2. L'analyse des séquences de nucléotides de l'ADN de pBB9Δ9 a montré que le traitement effectué avec la BAL31 décrite plus haut, a enlevé 4696 bp de l'opéron rrnB et a lié les régions du promoteur et de terminaison. En plus des régions intactes du promoteur et de terminaison, le plasmide contient le gêne codant pour le rARN 5S et les 267 premiers nucléotides correspondant au rARN 16S mature. La séquence des nucléotides autour de la jonction par fusion dans pBB9Δ9, est illustrée dans la figure 3.

Lors de la construction des vecteurs de réplica-

tion de la présente invention, les deux étapes suivantes ont compris l'élimination d'autres parties inutiles de l'ADN du plasmide pBB9Δ9, pour obtenir un petit plasmide ne portant que quelques sites de restriction. On a d'abord éliminé des sections inutiles au-delà de la région de terminaison. On a alors procédé selon une façon analogue à celle qui a été décrite à propos de la construction de pBB9Δ9. L'ADN de plasmide purifié a été linéarisé au site unique SalI du vecteur, traité ensuite avec la nucléase BAL31 pour enlever environ 800 nucléotides à chaque extrémité et digéré par l'endonucléase de restriction pvuII, et enfin traité avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase en présence des quatre dNTP pour combler les extrémités générées par BAL31. Le fragment d'ADN a été recircularisé par soudure des extrémités modifiées pour être rendues cohésives générées par PvuII avec les extrémités rendues cohésives et réparées par le fragment Klenow. Après la transformation en cellules HB101, on a préparé l'ADN plasmidique à partir de clones résistant à l'ampicilline, on l'a soumis à une digestion par plusieurs endonucléases de restriction et analysé le modèle de fragments résultant par électrophorèse sur gel d'agarose. Un plasmide convenable résultant de cette excision a été dénommé pBB9-b28 et choisi pour des études ultérieures. Dans ce plasmide, l'étape ci-dessus a éliminé le dernier 0,5 kb de l'insertion (au-delà des régions de terminaison) et 1,4 kb à partir du vecteur. La structure schématique de pBB9-b28 et la séquence de nucléotides autour de la jonction par fusion, sont représentées dans les figures 4 et 3 respectivement.

L'étape suivante a eu pour but d'éliminer des sections inutiles de l'insertion en face des promoteurs. Le plasmide pBB9-b28 a été coupé par EcoRi et FspII et les deux fragments résultant séparés sur gel d'agarose. Ces deux enzymes coupent le plasmide en des sites uniques. Le site EcoRI est dans la région du vecteur tandis que celui

de FspII est dans la région de rrnB, à peu près 400 bp en amont à partir du gêne de rARN 16S. Le plus long fragment contenant un squelette pBR (du site PvuII au site EcoRI) et l'opéron rrnB raccourci avec les deux promoteurs, a été réisolé à partir du gel, traité avec un fragment Klenow d'ADN polymérase pour convertir les bouts collants générés par EcoRI et FspII en extrémités et lié avec une polynucléotide ligase dans des conditions qui permettent la ligature des extrémités modifiées pour être cohésives et la recirculari-
10 sation. Cette procédure a régénéré les sites de coupure par EcoRI et FspII avec élimination d'un segment d'ADN d'environ 1,7 kb, si bien que le plasmide résultant, dénommé p408-5 (figure 5) a pû être coupé à la jonction vecteur-insert. Le plasmide p408-5 a été à nouveau modifié par cou-
15 pure au site de EcoRI, digestion par la nucléase BAL31 pendant des temps variés et resoudure. Après transformation en cellules HB101 de E. coli, on a récolté des colonies uniques que l'on a cultivées et l'on a réisolé l'ADN du plasmide à partir de chacune. Ils appartenaient à la série p419. Les
20 ADN des plasmides p419 ont été analysés pour déterminer le nombre et la localisation des sites de coupure des enzymes de restriction BspI, MspI et HhaI et certains des plasmides ont été davantage caractérisés par la détermination de leurs séquences de nucléotides dans la région promoteur.
25 Dans les deux plasmides p419-13 et p419-10 choisis par la Demanderesse pour procéder à une étude ultérieure, la longueur des excisions était de 164 et 197 bp respectivement. Les deux promoteurs de l'opéron rrnB étaient intacts dans p419-13, tandis que le promoteur P_1 a été enlevé par l'exci-
30 sion dans p419-10. Au cours des étapes suivantes de la construction du vecteur de réplication, la Demanderesse a utilisé ces deux plasmides comme matière de départ. Comme leurs structures sont fondamentalement identiques et qu'ils portent les mêmes sites de restriction, les étapes suivantes
35 ne seront décrites que pour des plasmides dérivés de p419-10,

pour simplifier la description. On peut suivre la même procédure en utilisant comme matière de départ l'un quelconque des plasmides de la série p419. La séquence de nucléotides autour de la jonction par fusion de pBR322-rrnB dans p419-10,est représentée dans la figure 3.

Pour produire un vecteur de réplication conforme à la présente invention, l'opéron de rARN raccourci doit être combiné avec une partie d'un opéron codant pour une protéine qui fournit les sections de signal de traduction. A ce propos, la Demanderesse a choisi un morceau d'ADN provenant de l'opéron lac de E. coli bien connu. Un fragment d'ADN convenable peut être obtenu par digestion du plasmide pLBU3 par EcoRI et HindIII. Le pLBU3 a été construit par R. Gentz et Coll. (Gentz, R., Langer, A., Chang. A.C.Y., Cohen, S.N. and Bujard, H.); le clonage et l'analyse des promoteurs forts sont rendus possibles par le déplacement en aval d'un signal de terminaison d'ARN. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4936-40, 1981). On obtient trois fragments, parmi lesquels le fragment désiré a une longueur d'environ 410 bp et il comprend, de l'extrémité EcoRI à l'extrémité HindIII, une section d'environ 160 nucléotides d'origine inconnue, une section de nucléotides correspondant au Pribnow-Box du promoteur lac, l'opérateur lac, le site fixant le ribosome, le signal d'initiation de traduction de ATG, suivi d'un morceau d'ADN codant pour les 68 premiers acides aminés de la bétagalactosidase. On sait que le polypeptide N-terminal de la bétagalactosidase codé par ce fragment n'a pas d'activité enzymatique lorsqu'il est seul, mais qu'il peut compléter le fragment C-terminal de l'enzyme codée par le chromosome d'une cellule-hôte convenablement choisie, si bien que sa présence peut être facilement détectée sur des plaques d'indicateur X-gal.

Pour obtenir un plasmide convenable qui permet l'insertion du fragment pLBU3 généré par EcoRI-HindIII dans l'opéron rrnB raccourci dans une orientation correcte, le

plasmide p419-10 a été modifié de la façon suivante : le plasmide a été coupé par StuI entre le promoteur P_2 et le site unique HindIII, des linkers EcoRI ont été soudés aux extrémités modifiées pour être rendues cohésives, l'ADN lié a été traité avec EcoRI et à nouveau soudé pour fournir le plasmide p808-2 (figure 6). Ce plasmide a été coupé par EcoRI et HindIII et ensuite soudé au fragment EcoRI-HindIII de 410 bp provenant de pLBU3. A la suite d'une transformation en cellules ED8800 de E. coli, on a recherché l'activité béta-galactosidase sur des plaques d'indicateur X-gal des colonies contenant le plasmide désiré. Des colonies bleu pâle ont apparu après 24-36 heures d'incubation, indiquant un faible taux de réplication de lac alphapeptide. L'ADN plasmidique a été isolé à partir de colonies uniques et leur structure c'est-à-dire la présence du fragment EcoRI-HindIII de 410 bp inséré dans p808-2 entre les sites appropriés, a été confirmée par une analyse effectuée avec des enzymes de restriction. Un représentant de ces clones a été dénommé p827-10 (figure 6).

Pour créer des vecteurs de réplication ayant une région de contrôle de la réplication la plus efficace, le plasmide p827-10 a été encore modifié par variation de la distance entre le promoteur rrnB et le site de fixation du lac ribosome. Des bases en nombres différents (sur environ 400 paires de bases) situées entre les points de départ de la traduction et de la transcription, ont été éliminées au cours d'excisions in vitro réalisées par une digestion contrôlée par BAL31. Pour cela, on a coupé le plasmide p827-10 avec EcoRI, on l'a soumis à une digestion par la nucléase BAL31, on a comblé les extrémités et enfin lié l'ADN. Après transformation en cellules ED8800, on a identifié des colonies ayant une activité béta-galactosidase sur des plaques d'indicateur X-gal. Grâce à leur couleur bleu sombre sur les plaques d'indicateur, on a sélectionné ces colonies pour les analyser davantage ; elles ont présenté

un taux élevé de synthèse α-peptidique. A partir de ces clones, l'ADN du plasmide a été isolé et séquencé pour déterminer la structure exacte de la région de contrôle. Ces plasmides appartiennent à la série pER. On a trouvé que les plasmides étaient de type différent, selon la jonction entre les régions rrnB et lac. Certains de ceux-ci contenaient un promoteur hybride consistant en la région -35 depuis le promoteur P_2 de rrnB et la région -10 à partir du promoteur lac. La Demanderesse a dénommé "rac" cette région promoteur hybride et a prélevé un plasmide portant le promoteur rac pour procéder à une étude ultérieure, sous le nom de pERIII-8. La structure de la région hybride de contrôle de la réplication dans pERIII-8, est représentée dans la figure 7.

Les plasmides ci-dessus satisfont à presque toutes les exigences concernant un vecteur de réplication idéal, mais ils n'offrent que des possibilités limitées pour insérer des gênes étrangers. Ceci peut être fait en utilisant, soit le site PvuII unique dans la région codant pour l'alpha-peptide, soit le site HindIII qui est aussi unique à l'extrémité de la région lac. Pour obtenir des vecteurs de réplication plus souples qui permettent l'insertion de fragments d'ADN générés à l'aide des endonucléases de restriction les plus courantes et dans tous les cadres de lecture possibles, la Demanderesse a inséré un court fragment de polylinker dans le site HindIII de pERIII-8. Ce fragment était un dérivé du polylinker porté par le plasmide pVX. Il a été produit de la façon suivante : le plasmide pHC314 (Boros I., Posfai Gy. and Venetianer P. High copy-number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322, 1984, Gene 30, 257-260) contenant le polylinker pVX (Seed, B., Purification of genomic sequences from bacteriophage libraries by recombination and selection in vivo. Nucl. Acids. Res., 11, 2427-2446, 1983) entre deux sites EcoRI, a été digéré par EcoRI et resoudé pour donner un plasmide avec deux polylinkers orientés tête-à-tête. On a pû facilement

isoler à partir de ce dernier plasmide, une forme modifiée du polylinker d'origine portant tous les sites de coupure mais dans un ordre différent, après digestion par HindIII. Il a été inséré dans le site HindIII de pERIII-8 pour produire pERIII-8pl. Des modifications supplémentaires du plasmide ci-dessus ont donné quatre plasmides (pERIII-8rl, -8r2, -8r3, -8r0) qui portent des sites uniques de coupure des endonucléases EcoRI, ClaI, BamHI, BglII et XbaI à l'extrémité de la région lac. Trois de ces quatre plasmides portent les sites ClaI et EcoRI en position différente par rapport au phasage de la traduction lac sans codon stop en phase. Ils permettent donc l'insertion d'ADN étranger dans ces deux sites dans tous les cadres de lecture possibles. Deux des plasmides offrent la possibilité d'introduire l'ADN selon deux cadres de lecture différents dans des sites Bglu, alors que le phasage des sites BamHI, XbaI, HindIII et PvuII est le même dans tous les plasmides. Les constructions de ces dérivés de pERIII-8 sont illustrées en détail dans les figures 8-11. Les positions des sites de restriction et leur relation par rapport au phasage de la traduction lac, sont indiquées dans le Tableau I. (Pour simplifier la description de la position d'un site de coupure de restriction par rapport au cadre de lecture de traduction, les phases sont définies et utilisées dans ce texte de la façon suivante : PH 1 : lorsque les 6 nucléotides du site de reconnaissance d'une endonucléase de restriction donnée forment deux codons intacts d'acides aminés ; PH 2 : lorsque les 5 premiers nucléotides du site de reconnaissance et le nucléotide les précédant forment deux codons intacts d'acides aminés et PH 3 : lorsque les 5 derniers nucléotides à partir du site de reconnaissance et le nucléotide suivant forment deux codons. Selon cette convention, le site HindIII à l'extrémité de la région lac est en PH 1.

Tableau I

Plasmides	PH 1	PH 2	PH 3
pERIII-8p1	HindIII EcoRI	BglII BamHI ClaI	XbaI PvuII
pERIII-8r1	HindIII EcoRI	ClaI	XbaI PvuII
pERIII-8r3	HindIII BamHI ClaI	-	EcoRI PvuII
pERIII-8r0	HindIII	-	XbaI ClaI PvuII
pERIII-8r2	HindIII ClaI	EcoRI	XbaI PvuII

Exemple 2

Pour illustrer l'utilité des vecteurs de réplication produits selon la présente invention, la Demanderesse va décrire la réplication dirigée par un plasmide pER de la chloramphénicol acétyl transférase dans des cellules de E. coli. La procédure décrite implique l'insertion d'un gêne CAT sans promoteur dans plusieurs plasmides pER pour obtenir des plasmides recombinants qui produisent le CAT natif sous le contrôle de différentes régions hybrides de régulation et les autres modifications de ces plasmides qui se traduisent par la synthèse de CAT comme partie d'une protéine fusionnée.

Le gêne qui confère une résistance vis-à-vis du chloramphénicol a été identifié d'abord dans un transposon, puis il a été transféré dans plusieurs plasmides recombinants à partir desquels il a pû être facilement isolé (Alton K.N. and Vapnek D. : Nucleotide sequence analysis of the chloram-

phenicol resistance transposon Tn9. Nature, 282, 864-869, 1979). La Demanderesse a utilisé l'un de ces recombinants, le plasmide pBR329 (Covarrubias L and Bolivar F. : Construction and chracterization of new cloning vehicules VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR238 lacking the 482-base-pair inverted duplication. Gene, 17, 79-89, 1982) comme source d'ADN pour isoler le gêne CAT sans sa propre région promoteur. Le plasmide pBR 329 a été coupé avec l'endonucléase TaqI, soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2 %, la bande correspondant au fragment 785 bp a été prélevée et l'ADN récupéré à partir de l'agarose. Ce fragment contient les sections d'ADN codant pour la protéine CAT et les sections donnant le signal de l'initiation et de la terminaison de la traduction (c'est-à-dire le site fixant le ribosome, le codon d'initiation et le codon stop), mais il ne contient pas le promoteur du gêne CAT. La structure schématique du fragment 785 bp de pBR321 obtenu à l'aide de TaqI, est représentée dans la figure 13. Le fragment isolé a été soudé à l'ADN du pERIII-8r0 coupé par ClaI et transformé en cellules JM107 de E. coli. Des cellules transformées ont été mises sur des plaques de milieu complet et identifiées par leur résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol. L'ADN du plasmide a été isolé à partir de 12 clones indépendants, résistant à l'ampicilline et au chloramphénicol, digéré par des endonucléases de restriction et le modèle du fragment a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. La Demanderesse a trouvé que tous ces plasmides contenaient le fragment TaqI de 785 bp dans la même orientation, c'est-à-dire que la direction de transcription de lac et CAT était la même. Un représentant de ces plasmides a été dénommé pER-CAT. A partir des sections connues de pERIII-8r0 et de pBR329, le pER-CAT devrait porter un opéron hybride, produisant un ARN contenant deux régions pour l'initiation de la traduction. Des cellules contenant l'un des plasmides pER-CAT produiront donc deux nouveaux poly-

peptides parmi lesquels, l'un est la protéine CAT native. Conformément à cette supposition, le modèle électrophorétique sur gel de SDS-polyacrylamide des protéines extraites à partir des cellules contenant le plasmide pER-CAT présente une bande supplémentaire correspondant à une protéine 24 kd qui peut être identifiée en tant qu'enzyme CAT native (figure 14).

Comme la Demanderesse désirait comparer l'efficacité des différentes régions hybrides de régulation rrnB-lac, le fragment contenant la région de contrôle de réplication de type pERIII dans pER-CAT a été remplacé par les fragments correspondants provenant de différents plasmides pER. On a coupé l'ADN de pER-CAT par PvuI, séparé les deux fragments résultants par électrophorèse sur gel d'agarose et réisolé le plus long à partir du gel. Ce fragment contient la partie C-terminale du gêne de la résistance à l'ampicilline, la région de réplication, la région de terminaison de rrnB et une courte région codant pour les derniers aminoacides du lac-alfapeptide. La région hybride de contrôle a été isolée de façon analogue à partir de différents plasmides pER. Des aliquots de fragment PvuI de pER-CAT isolé ont été liés à chaque fragment de pER isolé et les ADN ainsi soudés ont été transformés en cellules JM107. On a isolé les ADN de plasmide à partir des clones résistant à l'ampicilline et au chloramphénicol et on les a analysés avec des enzymes de restriction pour vérifier la présence de la région de contrôle désirée. La teneur protéinique de plusieurs clones contenant l'un des plasmides mentionnés ci-dessus, a été analysée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide. La Demanderesse a trouvé des différences significatives en ce qui concerne la quantité de CAT (certains des modèles obtenus sont représentés dans la figure 14). On a estimé que la quantité de CAT synthétisé dans des cellules contenant l'un des meilleurs plasmides atteignait 50 % des protéines totales des cellules, à partir d'un

balayage densitométrique des gels colorés avec du bleu brillant-comassie.

Tous les plasmides mentionnés ci-dessus contiennent le gêne CAT avec son propre site de fixation du ribosome, qui sépare la traduction de l'alpha peptide et celle de la protéine CAT. Pour caractériser la région hybride de contrôle par rapport à l'initiation de la traduction, dans l'étape suivante, la Demanderesse a fusionné les deux régions codant pour une protéine en éliminant les sections de signal de traduction de CAT. Pour cela, elle a traité l'ADN du pER-CAT d'origine avec du XbaI au site unique situé entre les régions codant pour lac et CAT, effectué une digestion par BAL31 et une recircularisation avec une ligase. Le cadre de lecture convenable a été assuré par application d'une sélection par le chloramphénicol pour la réplication de CAT. Des plasmides obtenus à partir de clones résistant au chloramphénicol ont été caractérisés par une analyse de restriction et l'un de ceux qui résultaient de la grande excision a été choisi pour procéder à une étude ultérieure. Il a été dénommé pER-CATf3. Il a un opéron fusionné dans lequel le codon du 60ème aminoacide du lac alfa-peptide est suivi par le codon du 9ème aminoacide provenant de CAT. Comme pER-CATf3 ne contient qu'un site de fixation du ribosome dans la région hybride de régulation rrnB-lac, il doit diriger la synthèse d'une protéine fusionnée ayant un poids moléculaire de 30 kd. Ceci a été vérifié par l'analyse des modèles des protéines extraites à partir de cellules contenant le pER-CATf3 (figure 14). Plusieurs différentes régions hybrides de régulation de pER ont été utilisées pour remplacer les sections de signal dans pER-CATf3 de façon analogue à celle qui est décrite à propos du pER-CAT. La quantité du polypeptide fusionné synthétisé sous le contrôle d'une région hybride régulatrice donnée a été trouvée proportionnelle à la quantité de CAT intact synthétisé sous le contrôle de la même région de régulation.

Exemple 3

L'efficacité des plasmides pER comme vecteurs de réplication pour un ADN eucaryote inséré, peut être observée à partir des résultats obtenus par insertion d'un gêne de la proinsuline dans pERIII-8. Le cADN codant pour la proinsuline humaine a été isolé à partir d'un plasmide recombinant qui a été construit au Biochemial Institute of BRC selon des méthodes classiques. Ce plasmide est un dérivé de pBR322 ; il porte le gêne de la proinsuline à queue poly dC-poly dG au site PstI. Pour obtenir un fragment d'ADN codant pour la proinsuline sous une forme susceptible d'être facilement insérée dans l'un des plasmides pER, le plasmide ci-dessus a été soumis à une restriction avec l'endonucléase PstI, le fragment du gêne de la proinsuline a été isolé à partir d'un gel d'agarose, traité avec la nucléase BAL31 et ensuite lié avec des linkers ClaI. L'insertion d' un tel fragment dans le site ClaI d'un vecteur approprié se traduit par une série de plasmides recombinants. Ceux-ci ont été analysés par séquençage de l'ADN et l'un de ceux qui ont l'insert tel que représenté dans la figure 13, a été choisi comme source pour l'isolation du gêne de la proinsuline. Dans ce plasmide, les trois nucléotides codant pour le premier aminoacide du gêne de la proinsuline ont été remplacés par les derniers nucléotides du linker ClaI qui formaient un codon Met. Pour isoler le gêne de la proinsuline, le plasmide ci-dessus a été soumis à une restriction avec ClaI, à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % et le fragment de 257 bp a été prélevé et récupéré à partir du gel. Ce fragment a été inséré dans le site ClaI de pERIII-8r0. Après transformation, les ADN du plasmide ont été préparés à partir d'un certain nombre de colonies et ceux-ci ont été utilisés pour confirmer que certains des plasmides avaient la structure désirée. La Demanderesse a déterminé à l'aide de la carte de restriction, que dans le plasmide pSzI153, le gêne de la proinsuline inséré est dans la même orientation

que la direction de la transcription de la région hybride rrnB-lac. De plus, ainsi que l'a révélé la détermination de la séquence des nucléotides, le gêne de la proinsuline était dans le cadre avec la traduction lac. On a donc supposé que le pSzI153 produirait un polypeptide fusionné lac-insuline ayant un poids moléculaire de 16 à 18 kd. Bien que la production de ce polypeptide ait été détectée par analyse sur gel de SDS-polyacrylamide d'extraits cellulaires contenant pSzI153, et que la présence du fragment peptidique correspondant à la proinsuline humaine ait été confirmée par précipitation de la protéine fusionnée avec des anticorps produits vis-à-vis de l'insuline humaine, on a trouvé que la quantité de protéine fusionnée était très faible, même dans des extraits provenant de cellules induites par IPTG. En utilisant des acides aminés marqués radioactivement, la Demanderesse a trouvé que la protéine fusionnée était dégradée rapidement dans des cellules JM107 de E. coli et a donc essayé d'augmenter la production de la protéine fusionnée en augmentant sa demi-vie. On sait que la stabilité d'une protéine étrangère dans des cellules de E. coli a pû être augmentée par combinaison de celle-là avec des protéines bactériennes natives. En conséquence, la Demanderesse a modifié le plasmide pSzl53 en allongeant le morceau d'ADN codant pour la bétagalactosidase. Un plasmide contenant le gêne de la bétagalactosidase intact (voir par exemple pRLT2, Erdei et Coll. : A novel type of bacterial transcription unit, spécifiant le rARN et le tARN Mol. Gen. Genet. 191, 162-164, 1983) a été soumis à une restriction avec les endonucléases PvuII et ClaI et un fragment de 700 bp codant pour les 33-263èmes aminoacides de la béta-galactosidase a été isolé à partir d'un gel d'agarose. Ce fragment a été lié avec le plus long fragment de pSzI153 qui a été obtenu avec les mêmes endonucléases de restriction. Ce dernier fragment est un dérivé linéaire de pSzI153 auquel manquent les derniers nucléotides de la région codant pour l'alpha-

peptide (jusqu'au site PvuII) et les premiers nucléotides de la région polylinker. Après soudure et transformation, on a choisi des plasmides sur la base du modèle des fragments de restriction et sélectionné l'un d'entre eux, qui présentait la structure désirée, en tant que vecteur modifié pour l'insertion du gêne de la proinsuline. La digestion de pSzI153 a donné deux fragments. Ils ont été séparés sur un gel d'agarose à 1,5 % et le plus petit, contenant le gêne de la proinsuline a été récupéré à partir de gel. On a lié ce fragment avec le vecteur modifié coupé par ClaI et transformé l'ADN en cellules JM 107 de E. coli. Pour assurer le cadre de lecture correct avant soudure, on a traité les deux fragments avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase en présence de chacun des quatre dNTP pour combler les extrémités 5' saillantes générées par ClaI. Des colonies de E. coli contenant chacune l'un des plasmides résultants, ont alors été sélectionnées grâce à leur résistance à l'ampicilline et l'ADN du plasmide a été isolé à partir d'un certain nombre de clones individuels. Une analyse détaillée par restriction a montré que certains de ces plasmides portaient le gêne de l'insuline inséré dans une orientation correcte, si bien que la traduction de l'opéron hybride a fourni un polypeptide fusionné comprenant les 263 aminoacides N-terminaux de la béta-galactosidase et les 86 aminoacides de la proinsuline humaine à la région C-terminale. Ce type de plasmide a été dénommé pSzL23. Des modèles de protéines de cellules de E. coli contenant pSzL23 ont confirmé la production d'un polypeptide supplémentaire ayant le poids moléculaire calculé par la protéine fusionnée (figure 14). En remplaçant la région de contrôle de réplication de type pERIII-8 du pSzL23 par les régions correspondantes de différents plasmides pER, la Demanderesse a constaté, de même que dans le cas de la réplication de CAT, que les quantités de la protéine fusionnée synthétisée sous le contrôle de différentes régions hybrides de régulation étaient très

variables. Parmi les plasmides comparés, certains fournissaient jusqu'à 5-10 % de la protéine totale par la synthèse de la protéine fusionnée.

La Demanderesse pense, à la suite de ces expériences, que les vecteurs de réplication construits conformément à la présente invention, peuvent être utilisés avec succès pour programmer un taux de production de protéines élevé dans des cellules de E. coli.

Légende des figures.

Fig. 1 Structure schématique du plasmide recombinant pBB9. L'ADN du vecteur (pBR322) est symbolisé par une double ligne ouverte, l'ADN inséré par une épaisse ligne noire. Le cercle intérieur montre la localisation des unités fonctionnelles : amp = ADN codant pour la résistance à l'ampicilline ; tet = ADN codant pour la résistance à la tétracycline ; 16S, 23S, 5S = séquences d'ADN correspondant aux ARN ribosomaux matures ; P = promoteur ; T = terminaison ; λ = ADN provenant du chromosome du bactériophage lambda. Des sites de coupure par des endonucléases de restriction sont indiqués par des flèches : E = EcoRI ; B = BamHI ; P = PstI ; H = HindIII ; S = SalI, Hp = HpaI ; Pv = PvuII, F = FspII.

Fig. 2 Structure schématique du plasmide recombinant pBB9Δ9 Les symboles sont les mêmes que dans la figure 1. L'excision est représentée par une zone ombrée.

Fig. 3 Les séquences de nucléotides des jonctions dans des plasmides obtenus par élimination de parties des molécules recombinantes, effectuée étape par étape. A, Jonction entre la première partie du gêne de rARN 16S et la dernière partie du gêne de rARN 23S, c'est-à-dire la jonction qui a été créée par suppression d'une partie de l'opéron rrnB provenant du pBB9 pour construire pBB9Δ9.

B, Jonction entre l'ADN bactérien suivant la région de terminaison de l'opéron rrnB et l'ADN de pBR322, c'est-à-dire la jonction créée par l'excision qui a été faite pour construire pBB9-b28 à partir de pBB9Δ9.

C, Jonction entre la région promoteur de l'opéron rrnB et l'ADN de pBR322, c'est-à-dire la jonction créée par l'excision qui a été faite pour construire p419-10 à partir de p408-5.

Fig. 4 Structure schématique du plasmide recombinant pBB9-b28. Les symboles sont les mêmes que dans les figures 1 et 2.

Fig. 5 Structure schématique du plasmide p408-5
Les symboles sont les mêmes que dans les figures 1 et 2.

Fig. 6 Etapes successives de la construction des plasmides pER. On n'a indiqué que les sites de coupure par une enzyme de restriction qui sont utilisés dans la construction. Barre noire pleine : région codant pour le rARN. Barre hachurée : région codant pour la béta-galactosidase. P et T : promoteur et terminaison de rrnB, Ap^R : région codant pour la béta-lactamase, R_o : origine ("origo") de la réplication. Les origines des fragments constituant les plasmides sont représentées dans le centre. Δ : excisions.

Fig. 7 Séquence de nucléotides de la région hybride régulatrice du plasmide pERIII-8. Des nucléotides provenant de l'opéron lac sont écrits en italiques. Ligne en pointillés : région prépromoteur riche en AT de P_2 de rrnB ; ligne pleine : région -3S du promoteur P_2 de rrnB ; ligne double : région -10 (Pribnow-Box) du promoteur de lac ; * : point de départ de l'initiation de la transcription ; ligne brisée : site de fixation du ribosome. L'opérateur lac et les deux premiers codons de la béta-

galactosidase sont aussi indiqués.

Fig. 8 Construction de la région polylinker du plasmide pERIII-8r1. Le fragment polylinker de pERIII-8r1 (bas) a été obtenu en coupant le pERIII-8p1 avec XbaI et avec EcoRI (α), en comblant les extrémités collantes de l'ADN (β) et en effectuant une religature (γ). Cette procédure a éliminé 69 nucléotides (c'est-à-dire 23 codons), si bien que le phasage n'a pas été changé (HindIII, EcoRI:PH 1 ; ClaI: PH2; XbaI: PH 3).

Fig. 9 Construction de la région polylinker du plasmide pERIII-8r3. Le fragment polylinker du pERIII-8r3 (bas) a été obtenu en coupant le pERIII-8p1 à la fois avec XbaI et avec BamHI (α), en comblant les extrémités collantes de l'ADN (β) et en effectuant une religature (γ). Cette procédure a éliminé 56 nucléotides (c'est-à-dire18 codons + 2 nucléotides) et n'a donc pas changé le phasage à partir du site BamHI (HindIII, BamHI, ClaI : PH 1 ; EcoRI : PH 3).

Fig. 10 Construction de la région polylinker du plasmide pERIII-8r0.
Le fragment polylinker du pERIII-8r0 (bas) a été obtenu en coupant pERIII-8r1 (haut) avec EcoRI (α), en comblant les extrémités collantes de l'ADN (β) et en effectuant une religature (γ). Cette procédure a ajouté des nucléotides, si bien que cela a modifié le phasage à partir du site HindIII (HindIII : PH 1 ; XbaI, ClaI : PH 3).

Fig. 11 Construction de la région polylinker du plasmide pERIII-8r2.
Le fragment polylinker du pERIII-8r2 (bas) a été obtenu en coupant pERIII-8p1 (haut) à la fois avec BglII et avec BamHI (α), en comblant les extrémités collantes de l'ADN (β) et en effectuant une ligature (γ). Cette procédure a éliminé 50

nucléotides (c'est-à-dire 16 codons + 2 nucléotides) et a donc modifié le phasage à partir du site ClaI (HindIII, ClaI : PH 1 ; EcoRI : PH 2 ; XbaI : PH 3).

Fig. 12 Structure schématique des vecteurs de réplication pER et des séquences de nucléotides des régions polylinkers.
On n'a indiqué que les sites de restriction qui sont convenables pour changer les régions de régulation entre différents plasmides pER. Le cadre de lecture de la traduction démarrant au codon initiateur lac est indiqué sur les sections de polylinker.

Fig. 13 Structure schématique des deux fragments d'ADN qui ont été insérés dans des plasmides pER pour mettre en évidence la production de protéine.
A, Structure du fragment TaqI de pBR329 codant pour CAT.
B, Structure du fragment d'ADN codant pour la proinsuline humaine.

Fig. 14 Protéines extraites à partir de cellules JM107 contenant différents plasmides pER.

Echantillons

1 JM107-pER-CAT(région promoteur de pERIII-8)
2 JM107-pER-CAT(région promoteur de pERVI-21)
3 JM107-pER-CAT(région promoteur de pERVI-20)
4 JM107-pER-CAT(région promoteur de pERVI-23)
5 JM107-pER-CATf3(région promoteur de pERIII-8)
6 JM107-pER-CATf3(région promoteur de pERVI-21)
7 JM107 -
8 JM107-pSZIL23(région promoteur de pERVI-23)
9 JM107-pSUIL23(région promoteur de pERVI-23)

SOUCHES ET PLASMIDES

Escherichia coli HB101

/pro$^-$, leu$^-$, thi$^-$, lac$^-$, str^R, r$^-$, m$^-$, endoI$^-$; Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. /1969/ A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in E.coli. J. Mol. Biol. 41, 459-472/

Escherichia coli ED8800 ;

/supE, supF, hsdS$^-$, met$^-$, lacZM15, recA56; Murray, N.E., Brammer, W.J. and Murray, K. /1977/ Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol. gen. Genet. 150, 53-61 /

E. coli K12 JM107; Yanisch-Perron, C., Vieria, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33 /1985/ 103-119.

$\lambda rif^d 18$

/Kirschbaum, J.B. and Konrad, E.B. /1973/ Isolation of a specialized lambda transducing bacteriophage carrying the beta subunit gene for Escherichia coli ribonucleic acid polymerase. J. Bacteriol. 116, 517-526 /

pBR322

/Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Betlach, M., Heyneker, H.L,, Boyer, H.W., Crosa, J. and Falkow, S. /1977/ Construction and characterization of new cloning vehicles. Gene 2, 95-113 /

pBR329

/Covarrubias L and Bolivar F.: Construction and characterization of new cloning vehicles VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. Gene, 17, 79-89, 1982/

pLBU3

/Gentz, R., Langer, A., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Bujard, H. /1981/ Cloning and analysis of strong promoters in made possible by the downstream placement of a RNA termination signal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4936-40/

pHC314

/Boros I., Pósfai Gy. and Venetianer P. /1984/ High copy-number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322, Gene 30, 257-260/

MATIERES ET METHODES

Endonucléases de restriction : BamHI, BspRI, HpaI, SalI, PvuII, EcoRI, MspI, HindIII, PstI, BglII, XbaI sont purifiées au Biochemical Institute of BRC conformément à des procédures bien établies (Roberts, R.J., Restriction and modification enzymes and their recognition sequences, Nucleic Acids Res. 11, r135-r173, 1983), ou bien elles proviennent des New England Biolabs. FspII et l'ADN ligase T_4 sont des dons généreux du Dr. M. Szekeres et du Dr. A. Udvardy respectivement. Les endonucléases de restriction ClaI, StuI et HhaI, la nucléase BAL31 et le fragment de Klenow d'ADN polymérase I de E. coli proviennent de BRL, la phosphatase alcaline bactérienne de Worthington, la ARNase et la lysisime de REANAL.

Les /γ-^{32}P/ATP et /α-^{32}P/dATP provenaient de Hungarian Isotope Institute, Budapest.

Tous les autres réactifs étaient des produits industriels de qualité analytique.

Milieux

On a cultivé des souches de E. coli dans un milieu complet contenant 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre. On a cultivé des colonies sur les mêmes milieux contenant 1,5 % de Bacto agar.

La présence de l'alpha-complément in vivo de la béta-galactosidase a été détectée sur des plaques d'indicateur X-gal contenant : 20 g d'acides Casamino, 6 g de Na_2HPO_4, 3 g de KH_2PO_4, 0,5 g de NaCl, 1 g de NH_4Cl, 15 g de Bacto-Agar, 20 mg de X-gal-diméthylformamide par litre, complétées avec 2 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de $CaCl_2$, 100 µg/ml amp.

Reactions enzymatiques

On a utilisé les endonucléases de restriction en suivant les recommendations des New England Biolabs.

Les soudures des extrémités cohésives ont été réalisées sur des volumes de 30-40 µl dans 66 mM de Tris-HCl à pH 7,6, 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de dithiothréitol, 1 mM d'ATP avec 1 unité de ligase T_4 pour 0,5-1,0 µg d'ADN. Les

réactions ont été incubées une nuit à 14°C.

Les soudures des extrémités modifiées pour être rendues cohésives ont été effectuées dans 25 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de dithiothréitol, 0,25 mM de spermidine, 1 mM d'ATP, 10 µg/ml de BSA, 30-40 µg/ml d'ADN, 50 u/ml de ligase T_4 à 14°C pendant 12-14 heures.

On a comblé l'extrémité 5' en effectuant un traitement avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase I en présence des quatre dNTP. Les milieux réactionnels contenaient 50 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dithiothréitol, 0,1 mM de chacun des quatre désoxynucléotides triphosphates,200-250 µg/ml d'ADN et 100 u/ml de fragment de Klenow d'ADN polymérase dans un volume final de 10-20 µl. Les réactions ont éfé effectuées à 37°C pendant 15 minutes.

Pour la construction des excisions, un ADN de plasmide convenablement coupé a été extrait avec du phénol-chloroforme, précipité avec de l'éthanol et dissous dans 600 mM de NaCl, 20 mM de Tris-Hcl à pH 8,0, 1,0 mM d'EDTA, 12 mM de $CaCl_2$, 12 mM de $MgCl_2$, pour obtenir une concentration finale en ADN de 200-250 µg/ml. On a ajouté 0,4-1,2 U de nucléase BAL31 pour 1µg d'ADN et incubé à 30°C. On a prélevé des aliquots après différentes durées de digestion. Le déroulement de la réaction a été suivi par électrophorèse sur gel d'agarose et la digestion effectuée avec des endonucléases de restriction dont on savait qu'elles avaient des sites de coupure dans la région à analyser. Après digestion, on a arrêté la réaction en réalisant une extraction avec du phénol-chloroforme, on a fait précipiter l'ADN avec de l'éthanol et traité avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase pour produire des extrémités modifiées pour être cohésives.

Préparation d'ADN

On a effectué des cultures de souches de E. coli contenant les plasmides désirés dans des milieux complets pour purifier l'ADN plasmidique. Lorsque A_{600} était de 0,6, on a ajouté du chloramphénicol dans les cultures jusqu'à une

concentration finale de 170 µg/ml et poursuivi l'incubation à 37°C pour réaliser l'amplification des plasmides. pour fabriquer des plasmides à grande échelle, on a préparé des lysats purifiés de la façon qui est décrite par Clewel, D.B. et Helinski, D.R. (Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli : purification and induced conversion to an open circular DNA form. 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62, 1159-1166). L'ADN a été isolé à partir des lysats purifiés soit selon la méthode utilisant du chlorure de césium/bromure d'éthidium, soit par chromatographie sur Sephacryl S1000. Des préparations à petite échelle ont été effectuées selon la méthode de Birnboim et Dolly (A rapid alkaline extraction procedure for sceening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979, 7, 1513).

Electrophorèse

L'électrophorèse de fragments d'ADN sur des gels horizontaux d'agarose à 0,8-2 % en piqures ou des gels verticaux de polyacrylamide à 4-8 % en piqures et l'électrophorèse des protéines sur des gels de SDS-polyacrylamide à 12 %, ont été réalisées dans des conditions classiques. Les fragments d'ADN ont été réisolés à partir des gels d'agarose et de polyacrylamide par électroélution ou selon la méthode qui est décrite par Hammarskjöld M. and Winberg G. (Isolation of DNA from agarose gels using DEAE paper. Application to restriction site mapping of adeno-virus type 16 DNA. 1980. Nucleic Acids Res. 8, 253).

on a mis en oeuvre toutes les autres méthodes de biologie moléculaire, de la façon qui est décrite par Maniatis, T., E.F. Fritsch, Sambrook J. : Molecular cloning, Cold Spring Harbor Lab. New York, 1982.

Plasmide/Souche	Numéro de dépôt	Date du dépôt
pBB9	00300	31 Octobre 1984
pBR 322	00298	12 Septembre 1984
p 408-5	00301	31 Octobre 1984
p 827-10	00307	31 Octobre 1984
pERIII-8	00302	31 Octobre 1984
pHC 314	00280	7 Mars 1984
pERIII-8r1	00303	31 Octobre 1984
pERIII-8r3	00304	31 Octobre 1984
pERIII-8r0	00305	31 Octobre 1984
pERIII-8r2	00306	31 Octobre 1984
E. coli HB 101	00290	25 Juillet 1984
E. coli ED 8800	00291	25 Juillet 1984
pBR 329	00299	12 Septembre 1984

Les plasmides et souches ont été déposés auprès de la Collection Nationale de Microorganismes (OKI, HONGRIE).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Vecteur de réplication pour la production de protéines dans des cellules de E. coli, contenant un opéron hybride, qui comprend des parties d'un opéron de rARN de E. coli et une partie d'un opéron codant pour une protéine.

2°) Vecteur de réplication selon la revendication 1, caractérisé en ce que cet opéron de rARN contient une excision qui élimine la majorité de la partie structurale de l'opéron.

3°) Vecteur de réplication selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que cette partie d'un opéron codant pour une protéine est une partie de l'opéron lac de E. coli.

4°) Vecteur de réplication selon la revendication 3, caractérisé en ce que cette partie de l'opéron lac de E. coli est le fragment EcoRI-HindIII du plasmide pLBU3.

5°) Vecteur de réplication selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le vecteur qui porte cet opéron hybride est un dérivé de pBR322.

6°) Vecteur de réplication selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'association de cet opéron de rARN et de cet opéron codant pour une protéine fournit une région promoteur hybride.

7°) Vecteur de réplication selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il contient aussi un polylinker au-delà de cet opéron codant pour une protéine.

8°) Plasmide pERIII-8, comprenant une portion de l'opéron lac de E. coli (nucléotides de - 14 à + 243, où + 1 est le premier nucléotide de lac mARN) et une partie du pBR322 (nucléotides de 2068 à 4278, où + 1 est le premier nucléotide du site EcoRI du pBR322), qui sont flanquées de portions de l'opéron rrnB de E. coli, le nucléotide en - 14 de l'opéron lac étant réuni au nucléotide en - 189 de l'opéron rrnB (où + 1 est le premier nucléotide de rARN 16S

mature), créant un promoteur hybride qui contient une région - 35 provenant du promoteur P_2 de rrnB et une région - 10 provenant du promoteur lac, dans lequel la portion de l'opéron lac contient aussi le site de fixation du ribosome et la région codant pour les 68 aminoacides N-terminaux de la béta-galactosidase, cette portion est fixée à une seconde portion de l'opéron rrnB par un site HindIII, suivant la région lac, la portion de l'opéron rrnB (une séquence de nucléotides de + 78 à + 270 réunie à une section de nucléotides de + 4965 à 5508) porte la région de terminaison de l'opéron rrnB, la portion de pBR322 contient la région qui assure une réplication de type ColE1 et le gêne codant pour la résistance à l'ampicilline, cette portion relie les deux portions de l'opéron rrnB de telle sorte que la région de terminaison provenant de l'opéron rrnB et la région de réplication provenant de pBR322 sont voisines.

9°) Dérivé du plasmide pERIII-8 dénommé pERIII-8r0 ayant un insert de 44 bp dans le site HindIII, dans lequel l'insert porte des sites uniques d'endonucléases XbaI et ClaI permettant l'insertion d'ADN étranger dans ceux-ci.

10°) Dérivé du plasmide pERIII-8 dénommé pERIII-8r1 ayant un insert de 40 bp dans le site HindIII, dans lequel l'insert porte des sites uniques des endonucléases XbaI, EcoRI et ClaI permettant l'insertion d'ADN étranger dans ceux-ci.

11°) Dérivé du plasmide pERIII-8 dénommé pERIII-8r2 ayant un insert de 58 bp dans le site HindIII, dans lequel l'insert porte des sites des endonucléases XbaI, ClaI et EcoRI permettant l'insertion d'ADN étranger dans ceux-ci.

12°) Dérivé du plasmide pERIII-8 dénommé pERIII-8r3 ayant un insert de 54 bp dans le site HindIII, dans lequel l'insert porte des sites des endonucléases BamHI et EcoRI permettant l'insertion d'ADN étranger dans

ceux-ci.

13°) Procédé de production de vecteur de réplication, qui comprend l'élimination de la majorité de la partie structurale d'un opéron de rARN de E. coli porté par un vecteur convenable pour obtenir un opéron de rARN raccourci, la combinaison de cet opéron de rARN raccourci avec une partie d'un opéron codant pour une protéine pour produire une région efficace hybride de contrôle de la réplication, l'insertion d'un fragment d'ADN codant pour un polypeptide désiré dans l'opéron combiné pour le placer sous le contrôle de cette région hybride de contrôle de la réplication.

14°) Procédé selon la revendication 13, dans lequel cet opéron de rARN raccourci est construit de telle manière qu'il contient des excisions qui se terminent dans les gênes de structures du rARN.

15°) Procédé selon la revendication 13 ou la revendication 14, dans lequel le vecteur convenable est un dérivé de pBR322.

16°) Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que les parties de pBR322 qui ne sont pas essentielles, sont éliminées par digestion enzymatique.

17°) Procédé selon les revendications 13 à 16, dans lequel cette région hybride de contrôle de la réplication est construite par combinaison de parties d'un opéron de rARN et d'une partie de l'opéron lac de E. coli et création d'excisions entre les deux régions pour obtenir une série de vecteurs dans laquelle sont choisis les vecteurs de réplication qui présentent une activité lac élevée.

18°) Procédé selon la revendication 17, dans lequel cette série de vecteurs est produit par digestion par la nucléase BAL31 de telle manière qu'il en résulte des promoteurs hybrides contenant une partie de l'opéron de rARN et une partie du promoteur lac.

19°) Procédé selon les revendications 13 à 18, caractérisé en ce qu'un fragment polylinker est fixé à

l'extrémité de la région lac pour obtenir des vecteurs de réplication qui permettent l'insertion d'ADN étranger dans un cadre de lecture différent.

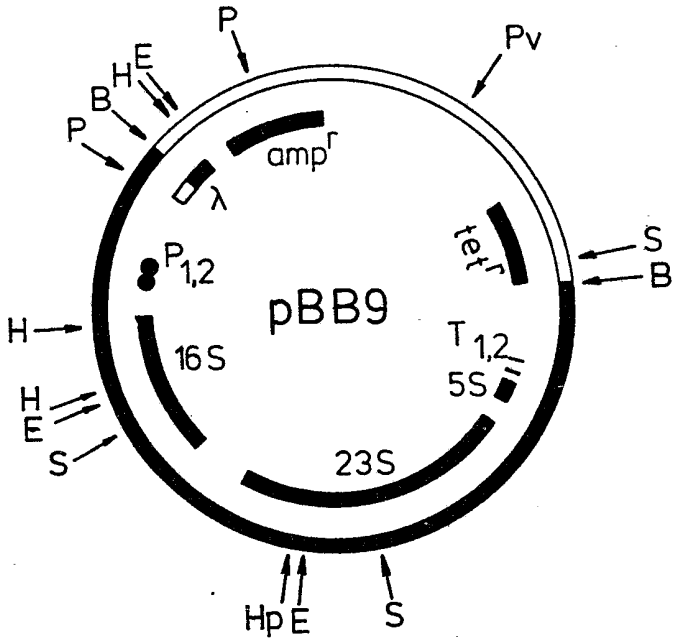

P
Pv
H
E
B
P
amp^r
λ
tet^r
S
B
P1,2
pBB9
H
16S
T1,2
5S
H
E
S
23S
Hp
E
S

Fig. 1

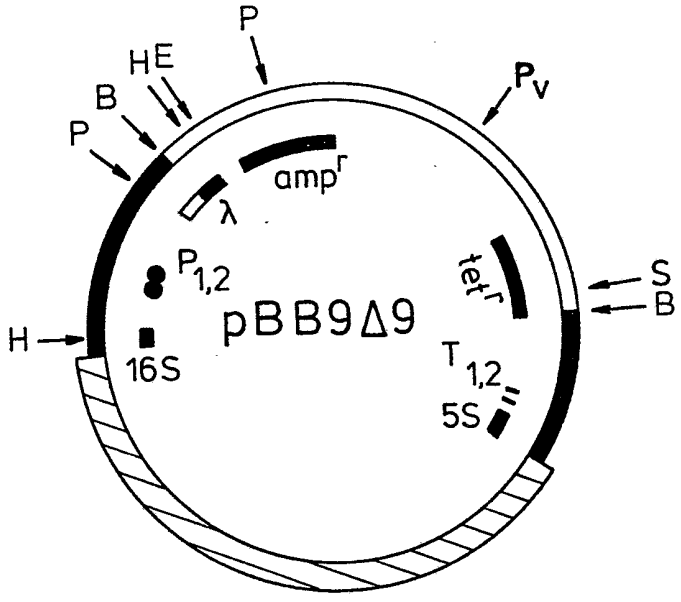

P
HE
B
Pv
P
amp^r
λ
P1,2
tet^r
S
B
pBB9Δ9
H
16S
T1,2
5S

Fig. 2

Fig. 3

A,

GTAGGTGGGGTAACGGCTCA*TGAACCGTGAGGCTTAACCTT*

260ème nucléotide du gêne de rARN 16S

dernier nucléotide du gêne rARN 23S

B,

ATCCCTGGCAGTATGCAACC*CTGCCTCGCGCGTTTCGGTGA*

ADN bactérien au-delà de l'opéron rrnB

2080ème nucléotide de l'ADN de pBR322

C,

CACATTTCCCCGAAAAGTGC*CCACTGACACGGAACAACGG*

4260ème nucléotide de l'ADN de pBR322

Région promoteur rrnB

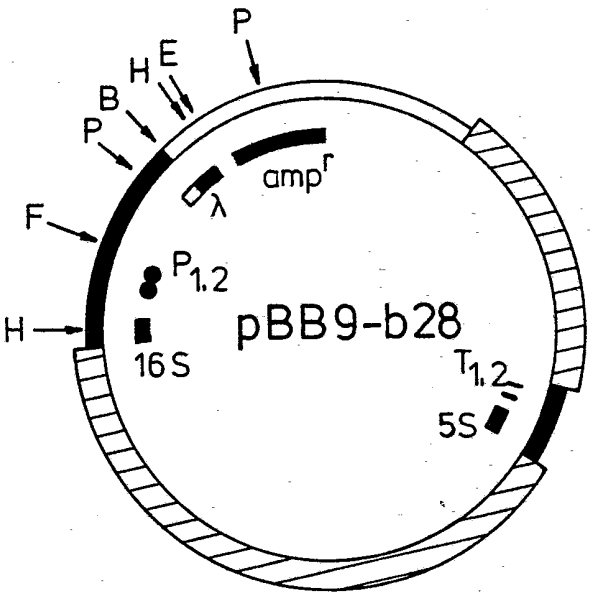

P
H
E
B
P
F
H
λ
amp^r
P1.2
16S
pBB9-b28
T1.2
5S

Fig. 4

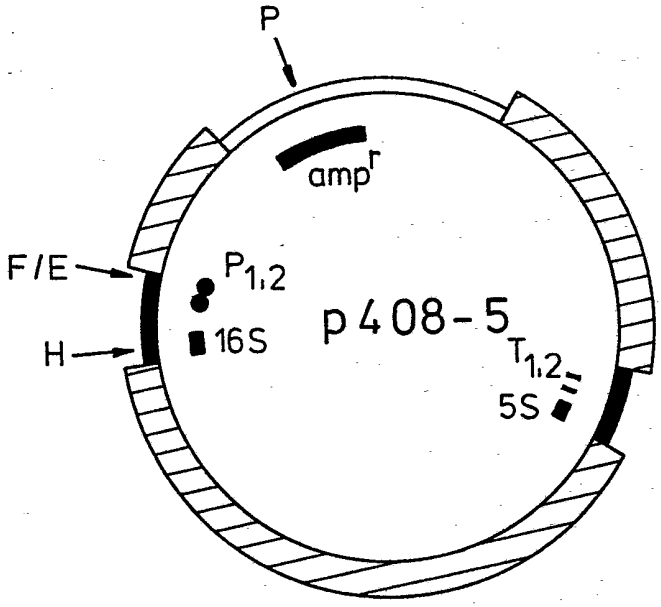
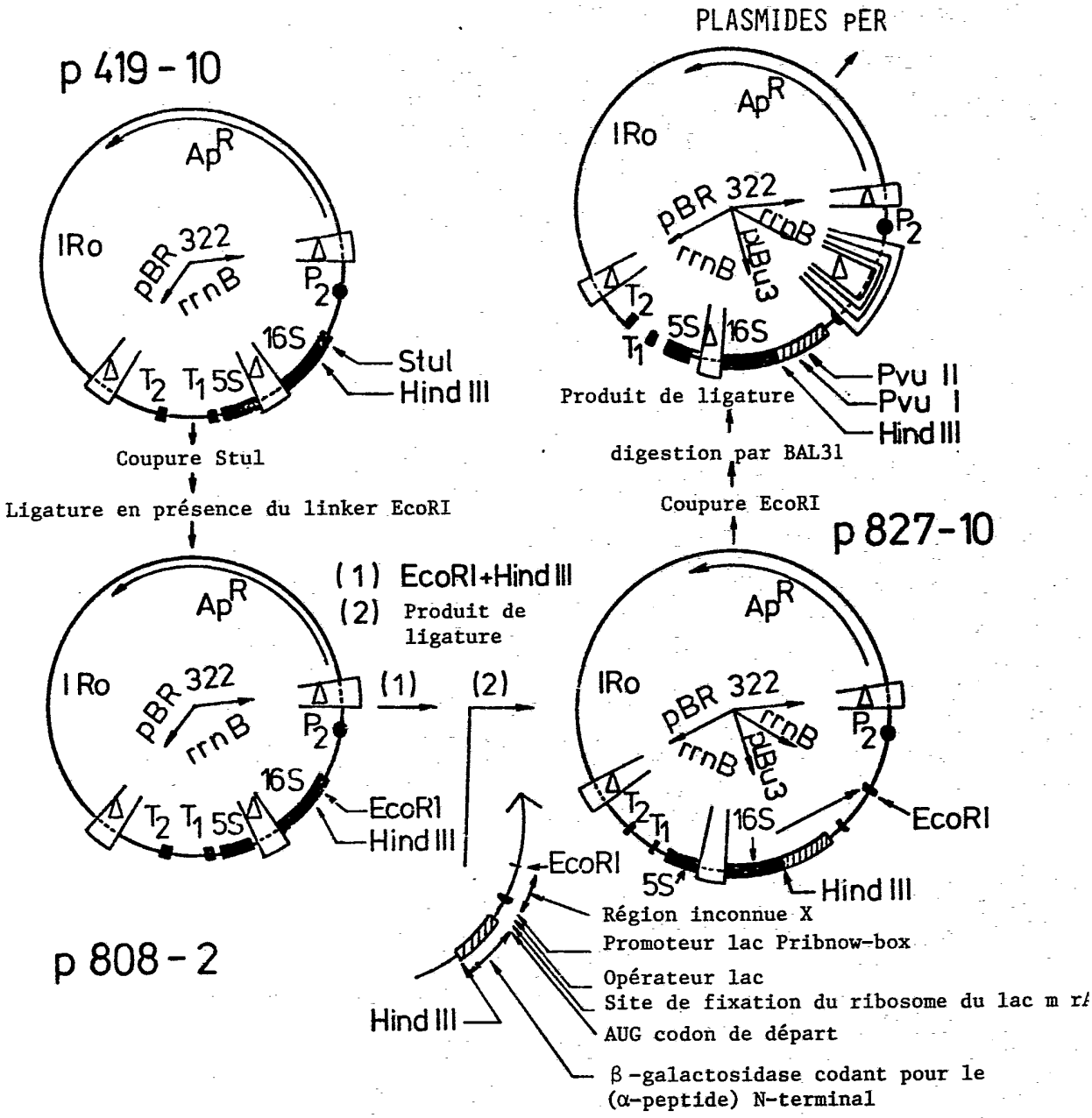

P
amp^r
F/E
H
P1.2
16S
p408-5
T1.2
5S

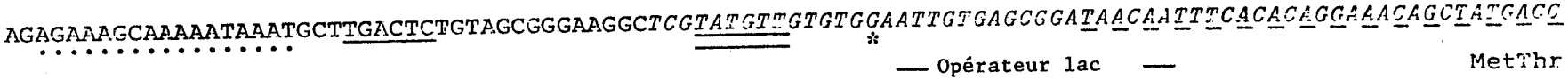
Fig. 5



FRAGMENT "B" ECORI-HINDIII DE PLBU3

Fig. 6

Fig. 7



2573773

Fig. 8

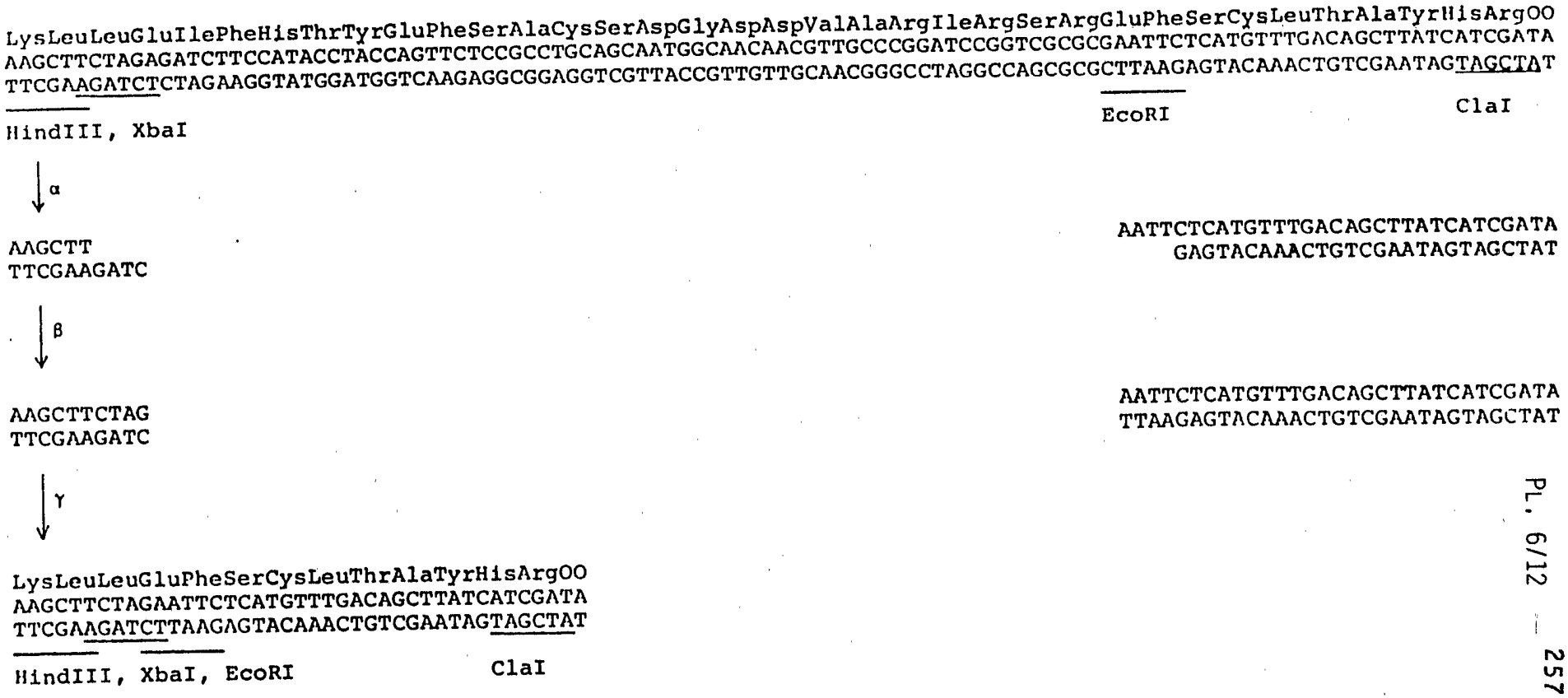
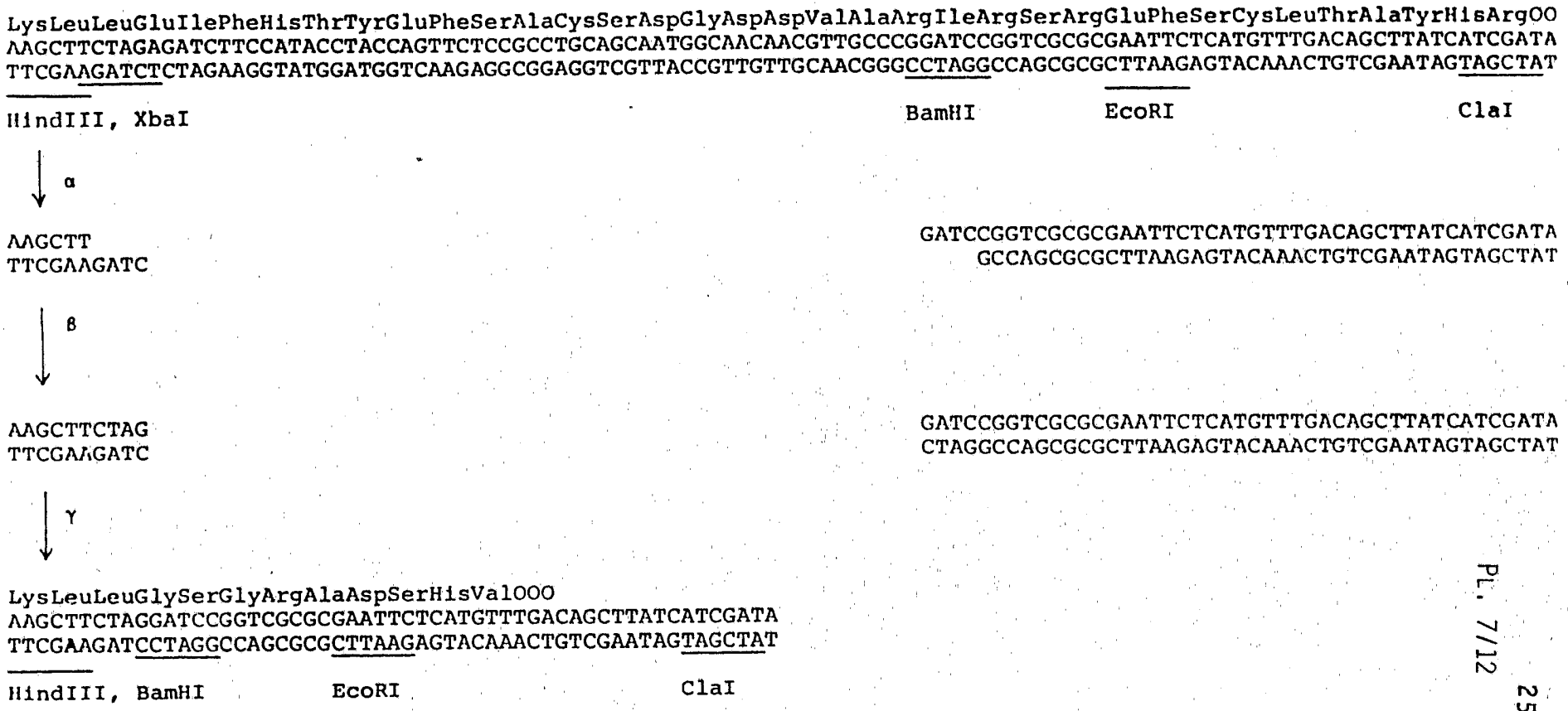

LysLeuLeuGluIlePheHisThrTyrGluPheSerAlaCysSerAspGlyAspAspValAlaArgIleArgSerArgGluPheSerCysLeuThrAlaTyrHisArgOO
AAGCTTCTAGAGATCTTCCATACCTACCAGTTCTCCGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCCCGGATCCGGTCGCGCGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
TTCGAAGATCTCTAGAAGGTATGGATGGTCAAGAGGCGGAGGTCGTTACCGTTGTTGCAACGGGCCTAGGCCAGCGCGCTTAAGAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
HindIII, XbaI
EcoRI
ClaI
α
AAGCTT
TTCGAAGATC
AATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
GAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
β
AAGCTTCTAG
TTCGAAGATC
AATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
TTAAGAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
γ
LysLeuLeuGluPheSerCysLeuThrAlaTyrHisArgOO
AAGCTTCTAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
TTCGAAGATCTTAAGAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
HindIII, XbaI, EcoRI
ClaI

Fig. 9



2573773

Fig. 10

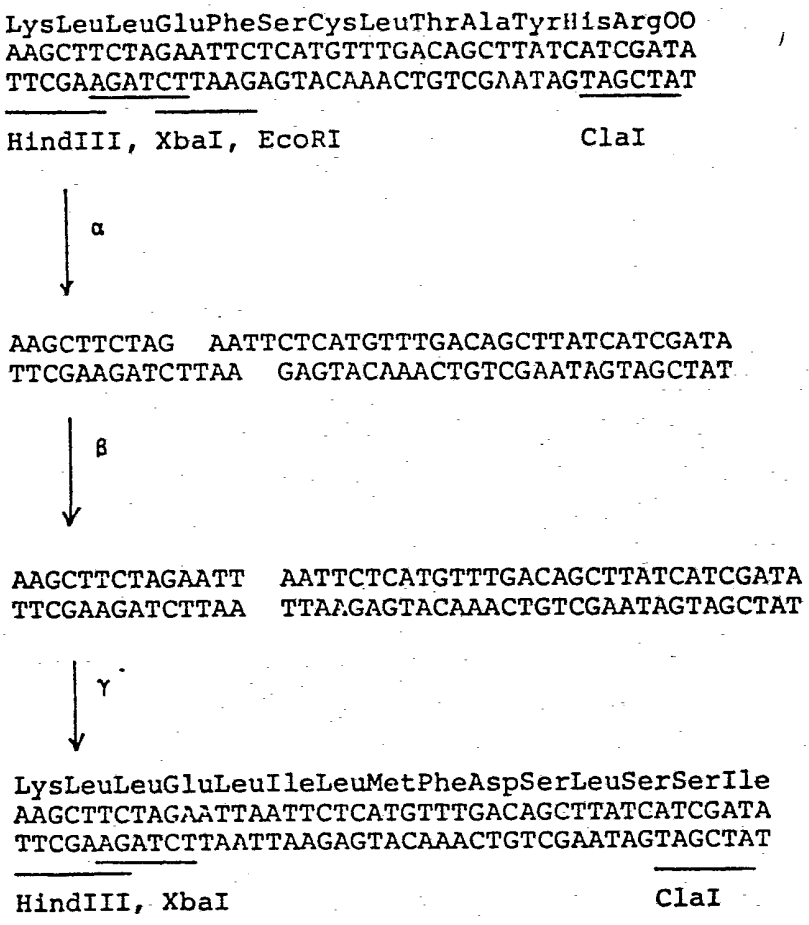
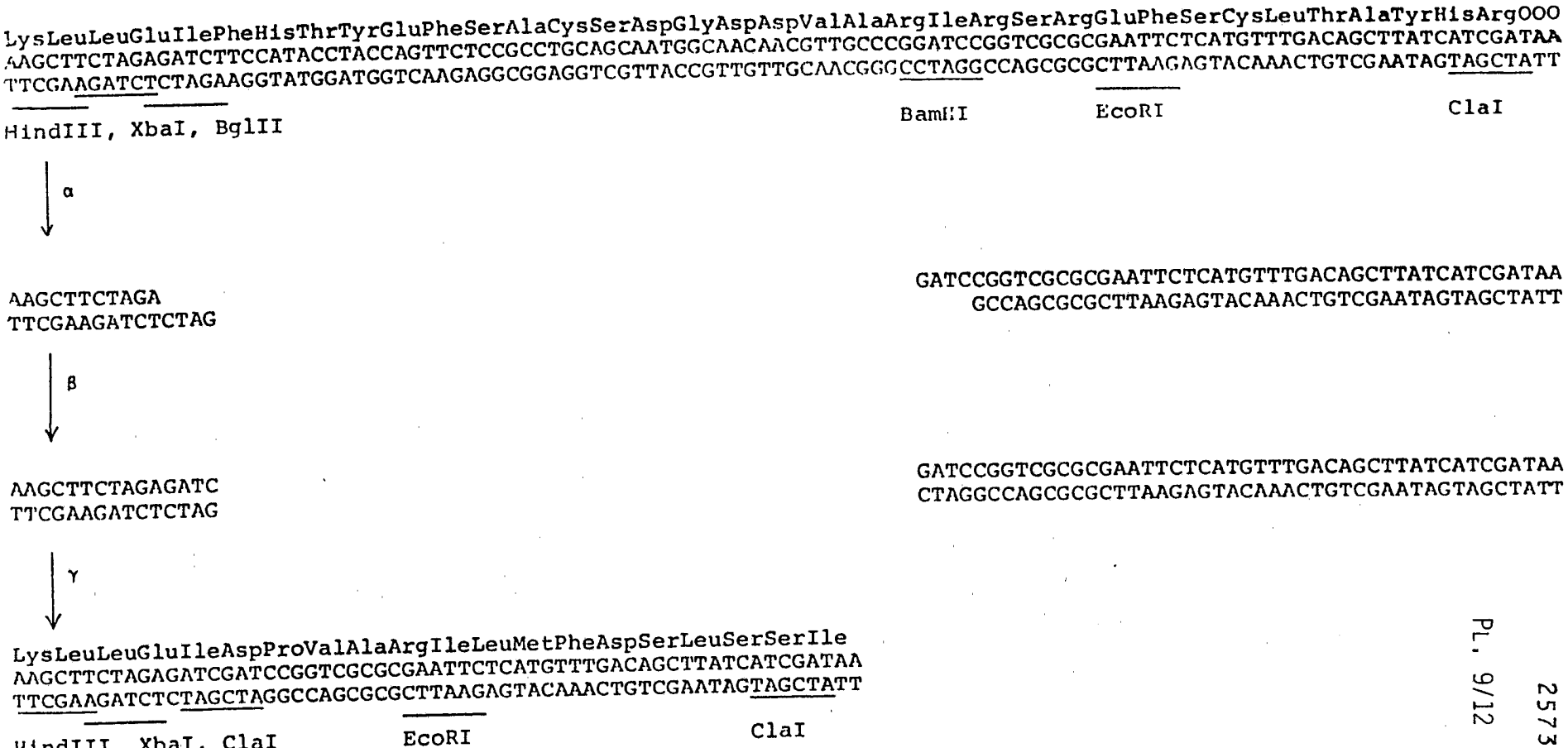
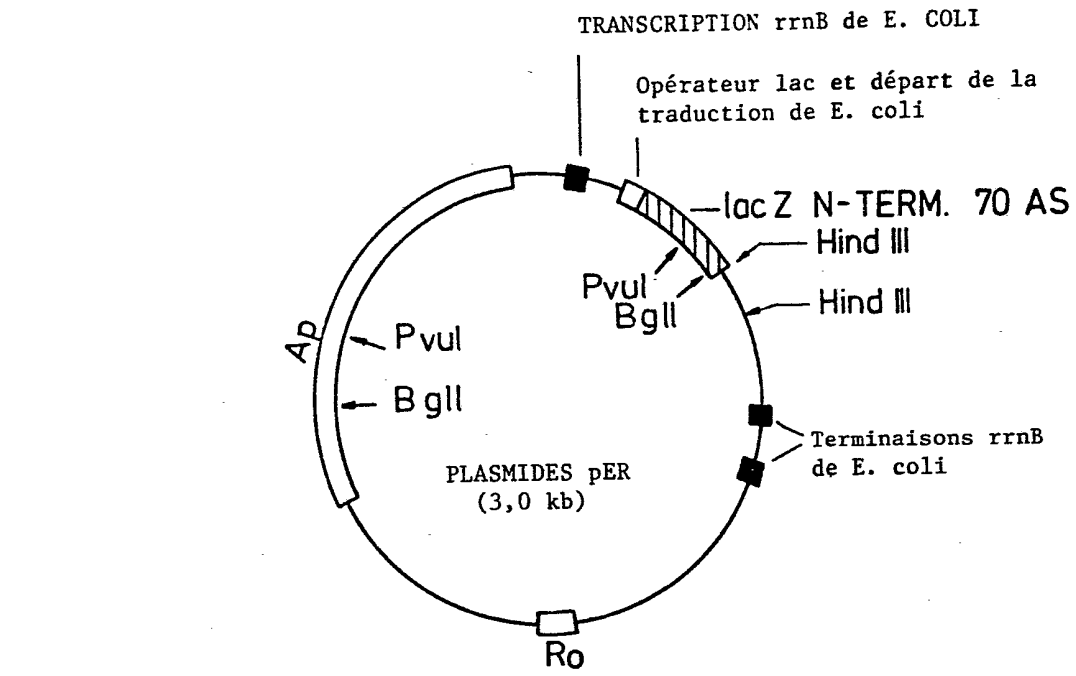

LysLeuLeuGluPheSerCysLeuThrAlaTyrHisArgOO
AAGCTTCTAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
TTCGAAGATCTTAAGAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
HindIII, XbaI, EcoRI
ClaI
α
AAGCTTCTAG AATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
TTCGAAGATCTTAA GAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
β
AAGCTTCTAGAATT AATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
TTCGAAGATCTTAA TTAAGAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
γ
LysLeuLeuGluLeuIleLeuMetPheAspSerLeuSerSerIle
AAGCTTCTAGAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
TTCGAAGATCTTAATTAAGAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTAT
HindIII, XbaI
ClaI

Fig. 11



2573773


TRANSCRIPTION rrnB de E. COLI
Opérateur lac et départ de la traduction de E. coli
lac Z N-TERM. 70 AS
Hind III
Pvul
BglI
Hind III
Ap
Pvul
BglI
Terminaisons rrnB de E. coli
PLASMIDES pER
(3,0 kb)
Ro

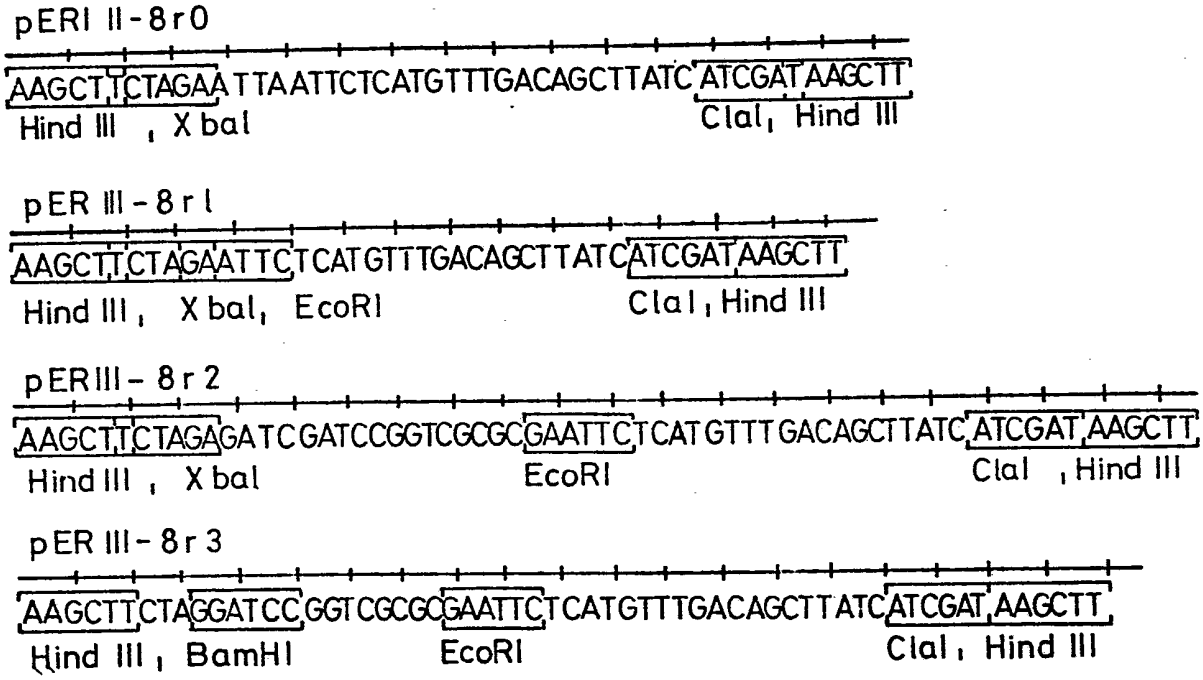
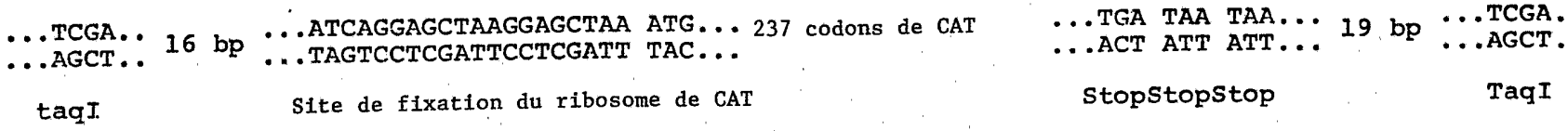

pERI II-8r0
AAGCTTCTAGAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTT
Hind III , X bal
ClaI, Hind III
pER III-8r1
AAGCTTCTAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTT
Hind III, X bal, EcoRI
ClaI, Hind III
pERIII-8r2
AAGCTTCTAGAGATCGATCCGGTCGCGCGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTT
Hind III , X bal
EcoRI
ClaI , Hind III
pER III-8r3
AAGCTTCTAGGATCCGGTCGCGCGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTT
Hind III, BamHI
EcoRI
ClaI, Hind III

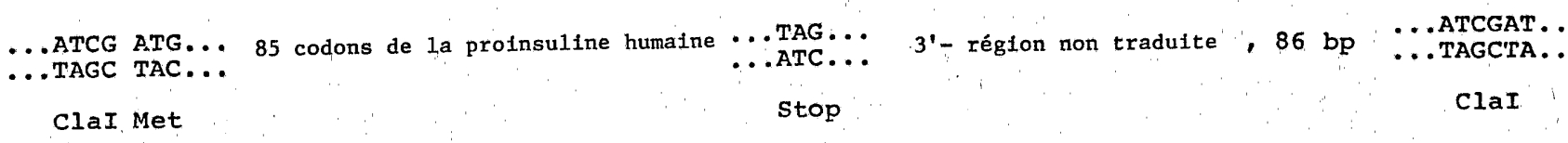
Fig. 12

Fig. 13

A,



B,



2573773

Fig. 14

