



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 887.397

Classif. Internat. :

C12N/C07G/A61

Mis en lecture le :

01-06-1981

Le Ministre des Affaires Économiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention ;**Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle ;**Vu le procès-verbal dressé le 5 février 1981 à 14 h. 40**au Service de la Propriété industrielle ;***ARRÊTE :**

Article 1. — *Il est délivré à la Sté dite : G.D. SEARLE & CO.,
P.O. Box 1045, Skokie, Illinois (Etats-Unis d'Amérique),
repr. par les Bureaux Vander Haeghen à Bruxelles,*

*un brevet d'invention pour : Technique à ADN de recombinant pour la
préparation d'une protéine ressemblant à l'interféron
humain,*

*qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet
déposées en Grande-Bretagne le 6 février 1980, n° 80 0394
le 28 février 1980, n° 80 06712, le 17 avril 1980,
n° 80 12666, le 24 avril 1980, n° 80 13592, le 12 mai
1980, n° 80 15646 et le 18 novembre 1980, n° 80 36951*

Article 2. — *Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.*

*Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.*

Bruxelles, le 27 février 1981

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE:

Le Directeur

087397

SS/CF/SB - CF 3334
B. 74 352 DS

DESCRIPTION

jointe à une demande de

BREVET BELGE

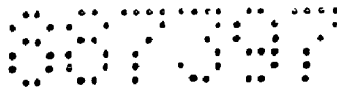
déposée par la société dite:

G.D. SEARLE & CO.

ayant pour objet: Technique à ADN de recombinant pour la
préparation d'une protéine ressemblant
à l'interféron humain

Qualification proposée: BREVET D'INVENTION

Priorité de six demandes de brevet déposées en Grande-
Bretagne, le 6 février 1980 sous le n° 80 03947, le 28
février 1980 sous le n° 80 06712, le 17 avril 1980 sous
le n° 80 12666, le 24 avril 1980 sous le n° 80 13592,
le 12 mai 1980 sous le n° 80 15646 et le 18 novembre
1980 sous le n° 80 36951



La présente invention concerne une technique à ADN de recombinant en vue de la préparation d'une protéine ressemblant à l'interféron humain.

5 L'interféron est une molécule naturelle qui est produite par des cellules en réponse à une infection virale et à certains autres stimuli, (voir, par exemple, Isaacs A. et Lindenmann J., Proc. Roy. Soc. B., (1957), 147, 258-267).

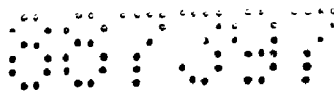
Cette molécule, lorsqu'elle est exposée à des cellules, rend ces cellules résistantes à l'infection virale.
10 Par conséquent, l'interféron constitue un agent antiviral bien connu (voir, par exemple, Isaacs A. et coll., (1957), Proc. Roy. Soc. B., 147, 268-273).

Depuis l'observation originale de l'activité antivirale, on a attribué un certain nombre d'autres propriétés à l'interféron (voir, par exemple, Stewart W.E., II, Interferon I, (1979), Academic Press, I. Gresser (Ed.)), y compris un rôle potentiel d'inhibition de la croissance de cellules cancéreuses in vivo (voir, par exemple, Paucker K. et coll., (1962), Virology, 7, 324-334; Gresser I. et coll., (1970), Ann. N.Y. Acad. Sci., 173, 694-699; Mellstedt H. et coll., (1979), Lancet, 1, 245-247; Blomgren H. et coll., (1976), Acta. Med. Scand., 199, 527-532; Merigan T.C. et coll., (1978), New Engl. J. Med., 298, 981-987 et Merigan T.C. et coll., (1978), New Engl. J. Med., 299, 1449-1453).

25 L'interféron manifeste également un degré marqué de spécificité vis-à-vis de l'espèce (cf. entre autres Tyrell D.A.J., (1959), Nature, 184, 452-453 et Gresser I. et coll., (1974), Nature, 251, 543-545), ce qui signifie que, pour le traitement d'une maladie humaine, on préfère l'interféron qui provient de cellules humaines.
30

Pour un rapport détaillé relatif à l'interféron, on peut se référer à l'ouvrage Texas Reports on Biology and Medicine, 35, 1979, publié par la University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, U.S.A., (S. Baron et F. Diazani, Editeurs).
35

Quant aux sources classiques, les cellules de culture de tissu constituent la seule source pratique de matière. Un procédé qui se base sur des cellules de culture de tissu est considéré comme exigeant une quantité importante



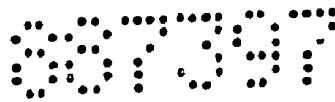
de travail, pas fiable, coûteux et donnant généralement de faibles rendements.

La présente invention a pour objet des moyens de préparation d'une protéine possédant des propriétés qui ressemblent à celles de l'interféron humain par la mise en oeuvre de techniques à ADN de recombinant dans des bactéries, qui sont meilleur marché et beaucoup plus fiables et qui offrent également la possibilité de produire des formes modifiées de l'interféron. Au surplus, on peut obtenir des rendements élevés en produit.

L'interféron est une glycoprotéine qui possède un poids moléculaire d'environ 20.000. Les séquences polypeptidiques aminotermiales des interférons humains et de souris sont connues (voir, par exemple, Knight E. Jr. et coll., (1980), Science, 207, 525-526; Zoon K.C. et coll., (1980), Science, 207, 527; et Taira H. et coll., (1980), Science, 207, 528-529).

Le schéma A qui termine le présent mémoire montre des régions choisies de ces séquences, en même temps que des possibilités de codons correspondants. Parmi les treize aminoacides connus chez l'interféron de fibroblaste FS-4, trois sont communs (soulignés) aux interférons de souris A et B que l'on obtient à partir de cellules de tumeur ascitique d'Ehrlich, cependant que seul un aminoacide est commun entre les interférons de lymphoblastoïde et de fibroblaste humain. En fait, au niveau de l'ADN, il semble qu'il y ait plus de probabilité de similitude entre l'interféron de fibroblaste humain et les interférons de souris A et B (pointillé) qu'entre les deux protéines humaines.

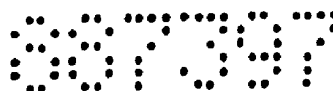
La région correspondant aux cinq restes aminotermiaux de l'interféron de fibroblaste humain présente manifestement un nombre minimal de permutations d'oligonucléotides de codage sur une séquence de longueur suffisante pour être raisonnablement spécifique pour un mRNA individuel dans une cellule eucaryote, (voir, par exemple, Montgomery D.L. et coll., (1978), Cell, 14, 673-680). Les codons pour les restes de sérine et de leucine ont été déduits en choisissant d'abord les triplets les plus susceptibles de montrer une homologie maximale avec les codons



de souris analogues. Les ambiguïtés subsistant alors dans ces triplets et les autres triplets ont ensuite été davantage réduites en agissant sur les fréquences connues d'usage de codons dans des gènes humains, (voir, par exemple, Grantham R. et coll., (1980), Nucl. Acids Res., 8, r47-r62). Il a par conséquent été possible de réduire le nombre de séquences de codage potentielles à deux, ne différant seulement que par le troisième résidu ou reste du codon de sérine qui ne manifeste pas de discrimination claire dans cette position. Sur cette base, on a déduit les séquences de deux oligodésoxyribonucléotides (IFIA et IB) dont on attendait qu'ils amorcent spécifiquement la synthèse de l'interféron cADN lors de l'incubation avec la transcriptase réverse et le polyA-mARN (3'-mARN à polyadénylation terminale) provenant de cellules "induites".

Un facteur supplémentaire qui intervient dans la prévision de la structure d'amorceurs spécifiques vis-à-vis du mARN d'interféron était la supposition qu'un reste ou résidu G dans l'ADN pouvait former une paire de bases modérément stable avec un reste ou résidu U dans l'ARN (ou un reste ou résidu T dans l'ADN). Par conséquent, si, dans certaines positions, les amorceurs contenaient un résidu G au lieu du résidu A correct, on pouvait encore s'attendre à un degré d'amorçage spécifique. (Voir, par exemple, Powers G.J. et coll., (1975), J.A.C.S., 97, 875-884).

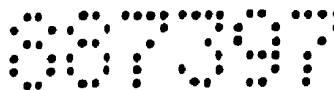
Les oligonucléotides (IFIA et IB) ont été synthétisés et radioactivement marqués à l'aide de ³²P-phosphate à leurs extrémités 5', hybridés à des préparations de mARN provenant de fibroblastes humains, "faussement induits" ou induits pour produire de l'interféron par amorçage avec de l'interféron et une superinduction subséquente en utilisant du poly(I):poly(C) et du cycloheximide et incubés avec l'enzyme qu'est la transcriptase réverse avec les substrats de désoxynucléoside triphosphate classiques. Seul l'IFIA a donné un transcrit d'environ 150 nucléotides, spécifique vis-à-vis du mARN de fibroblastes induits. La séquence nucléotidique de ce transcrit à brin négatif a été déterminée par mise en oeuvre de procédés connus et est montrée sur le schéma B qui figure à la fin du présent mémoire.



Le brin supérieur dans le schéma B est la séquence du transcrit d'ADN. Cette séquence d'ADN définit la séquence de l'extrémité 5' du mARN d'interféron de fibroblaste humain, représenté comme le brin inférieur dans le schéma A. La séquence de mARN définit à son tour la séquence protéinique, commençant à partir du premier AUG de la région amino-terminale de la molécule de précurseur d'interféron présumé.

On a synthétisé un second oligodésoxynucléotide (IFII) qui était complémentaire à une partie de la séquence déterminée comme indiqué sur le schéma C qui se trouve à la fin du présent mémoire. On a hybridé le [^{32}P] IFII comme décrit plus haut à du cADN préparé par mise en oeuvre de procédés connus à partir du mARN total provenant de cellules de fibroblastes induites et faussement induites et d'un transcrit produit de la manière précédemment indiquée. Lorsque l'on a fractionné les produits de cette réaction sur une base dimensionnelle en faisant appel à une électrophorèse à gel de dénaturation, on a obtenu un transcrit radioactif particulier d'environ 700 nucléotides à partir de cADN provenant de cellules induites mais non faussement induites.

Lorsqu'on l'a soumis à une électrophorèse à travers des gels natifs, le produit spécifique vis-à-vis de l'interféron avait une longueur d'environ 850 paires de bases (bp), correspondant approximativement à la dimension de la molécule de mARN d'interféron complète. Cette contradiction dimensionnelle peut être expliquée en présumant que le cADN d'interféron monocaténaire (à brin unique) tout en agissant comme un gabarit pour l'IFII, s'autoamorce en vertu de l'extrémité 3' se recroisant sur elle-même. Ce transcrit est ensuite allongé jusqu'à la position du transcrit amorcé à l'IFII où il est arrêté, engendrant ainsi un gène d'interféron bicaténaire (à double brin) de pleine longueur (c.à.d. un gène codant pour l'interféron), où l'extrémité 3' du transcrit autoamorcé et l'extrémité 5' du transcrit amorcé à l'IFII ne sont pas attachés par une liaison covalente. Par conséquent, le calibre ou la dimension du produit spécifique vis-à-vis de l'interféron variera en fonction du type



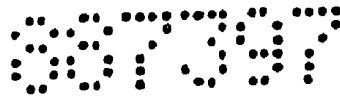
du système de gel.

Le gène d'interféron a été élué de gels natifs et séquencé par mise en oeuvre de procédés connus résultant de l'élucidation de la séquence de gène codant pour l'extré-
5 mité amino de l'interféron de fibroblaste mûr. On a également réalisé une version allongée de IFII, IFIII (représentée sur le schéma D qui figure en fin du présent mémoire) et on a répété le procédé décrit plus haut. On a obtenu les mêmes résultats.

10 Cette séquence confirme largement les prévisions utilisées dans la synthèse de l'IFIA. On peut constater, à partir d'une comparaison des schémas A et E qui accompa- gnent le présent mémoire, que la séquence de mRNA réelle spécifiant l'extrémité amino du polypeptide d'interféron
15 mûr est identique à celle sur laquelle la structure de l'IFIA était basée, à l'exception de seulement une différen- ce nucléotidique dans le codon pour le cinquième aminoacide à partir de l'extrémité amino du polypeptide mûr. Par consé- quent, hors d'un total de sept positions nucléotidiques
20 ambiguës, six étaient prévues correctement dans le cas de l'IFIA. (Voir, par exemple, Houghton M. et coll., (1980), Nucl. Acids Res., 8, 1913-1931).

On a ensuite réalisé un amorceur oligodésoxy- nucléotidique supplémentaire IFIV (représenté sur le schéma
25 D qui accompagne le présent mémoire) qui correspondait à une région proche de l'extrémité de la séquence nouvellement déterminée. En répétant le mode opératoire susmentionné, on a obtenu une information de séquence supplémentaire à partir de laquelle un autre amorceur IFV (représenté sur
30 le schéma D qui accompagne le présent mémoire) a été déduit et synthétisé. On a ensuite de nouveau répété le procédé. De cette manière, on a déterminé par étapes successives la séquence de gène entière codant pour le polypeptide d'inter- féron de fibroblaste mûr (qui figure sur le schéma E qui
35 accompagne le présent mémoire). (Voir, par exemple, Houghton M. et coll., (1980), Nucl. Acids Res., 8, 2885-2894).

Le schéma F que l'on retrouvera à la fin du pré- sent mémoire représente la séquence de gène bicaténaire qui code pour la séquence de mRNA non traduite en 5' et la



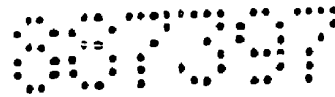
séquence de mRNA de codage pour protéine.

Un schéma illustratif des procédés de base mis en oeuvre pour cloner le gène d'interféron en plasmides bactériens figure à la fin du présent mémoire et constitue le schéma G.

Les produits finals de ces procédés étaient des recombinants contenant des gènes d'interféron codant pour le polypeptide d'interféron mûr et la séquence de mRNA d'interféron non traduite en 3'. Au surplus, ces recombinants contenaient une molécule d'amorceur IFIII précédant la séquence de gène d'interféron mûr et également une molécule de liant d'Hind III synthétique aux deux extrémités du gène.

Une séquence nucléotidique d'ADN partielle d'un de ces recombinants de gène d'interféron est représentée sur le schéma H qui accompagne le présent mémoire, qui montre qu'au cours des procédés de clonage (vraisemblablement en résultat du traitement par la S1 nucléase), le nucléotide terminal 5' de IFIII était perdu. De même, on a observé que le triplet de mRNA codant pour le résidu de tyrosine à la position d'acide aminé 30 dans la protéine mûre était UAU, plutôt que le triplet UAC qui avait été antérieurement déterminé par séquentialisation directe de transcrits réverses (voir le schéma E qui accompagne le présent mémoire). Ce changement de nucléotide "silencieux" est vraisemblablement une réflexion du polymorphisme du gène et signifie que les deux types de gène engendrent l'expression d'interférons identiques.

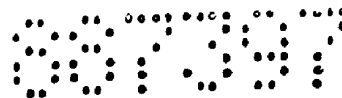
Afin d'exprimer le gène d'interféron dans des bactéries, on l'a transféré à partir de pBR 322 (voir, par exemple, Bolivar F. et coll., (1977), Gene, 2, 95-113) dans le site Hind III des plasmides dits d'expression pWT 2x1. Cette dernière série de plasmides contient la séquence du promoteur responsable de la transcription de l'opéron tryptophane et pourvoit aux besoins des trois phases de traduction possibles (voir, par exemple, la demande de brevet britannique publiée n° 2.052.516). Cependant, si le gène d'interféron est inséré dans ces plasmides dans l'orientation correcte, eu égard à la transcription, seul



l'un d'entre eux donnera l'expression fidèle du gène.
 A partir de la séquence montrée sur le schéma H qui accom-
 pagne le présent mémoire, on a prévu que le pWT 221 assure-
 rait la phase de traduction "ouverte" nécessaire à l'expres-
 5 sion fidèle du polypeptide d'interféron mûr, bien que ce
 dernier fût fusionné à un peptide amino terminal des
 soixante restes résultant de l'expression de la séquence
 de gène trp E courte et des molécules de liant d'Hind III
 présentes dans les plasmides pWT 2x1 et également de l'
 10 expression du liant d'Hind III et de l'amorceur IFIII uti-
 lisé dans le clonage original du gène d'interféron. En fait,
 lorsque l'on a transféré le gène d'interféron aux plasmides
 pWT 2x1 et déréprimé le promoteur de trp par incubation en
 l'absence de tryptophane et en présence d'acide 3 β -indole
 15 acrylique, on n'a seulement pu démontrer une activité anti-
 virale que dans le cas du dérivé pWT 221, comme prévu.

La figure 1 des dessins ci-annexés (dans laquelle
 Veros = cellules témoin non infectées du virus EMC (virus de
 l'encéphalomyocardite), Std. A = standard A d'interféron,
 20 Std. B = standard B d'interféron, 221 = extrait de recombi-
 nant contenant le gène d'interféron inséré dans pWT 221,
 231 = extrait de recombinant contenant le gène d'interféron
 inséré dans pWT 231, 231 + Std. B = extrait de recombinant
 contenant le gène d'interféron inséré dans pWT 231 auquel
 25 on avait ajouté le Standard B d'interféron préalablement à
 l'extraction et EMC = cellules témoin infectées du virus
 EMC), montre un résultat typique obtenu lorsque des extraits
 bactériens sont titrés en ce qui concerne l'activité anti-
 virale dans un système in vitro. Dans ce système, on a dilué
 30 les échantillons par étapes de 0,5 \log_{10} et on les a appli-
 qués à des monocouches de cellules de callitriche d'Afrique
 (Veros). Après une nuit d'incubation, on a attaqué les cel-
 lules par le virus EMC avant la coloration des cellules,
 si bien que l'on a constaté que les échantillons contenant
 35 l'activité d'interféron protégeaient les cellules vero
 contre l'effet cytopathogène (cpe) du virus. En comparant
 les résultats obtenus avec ceux obtenus avec des standards
 d'interféron, on peut établir le niveau d'activité.

On n'a pas décelé d'activité dans des extraits



des recombinants d'interféron pWT 211 ou pWT 231 (seul le
résultat obtenu avec le recombinant pWT 231 est montré sur
la figure 1), tandis que l'activité observée à partir des
extraits de recombinants pWT 221 est équivalente à un rende-
ment approximatif de 10^6 à un rendement approximatif de 10^6
5 unités de référence internationale d'interféron par litre
de bactéries (c.à.d. équivalente à 10^6 unités d'une prépa-
ration d'interféron standard internationale, 1 unité étant
définie par la quantité qui entraîne une réduction de 50 %
10 de la répllication du virus en culture de tissu). Il est
vraisemblable qu'une activité d'interféron considérable
est perdue au cours du procédé d'extraction, étant donné
que lorsque l'on ajoute un standard d'interféron de fibro-
blaste au recombinant pWT 231 préalablement à l'extraction,
15 on n'obtient seulement qu'une récupération d'environ 30 %.

(Il faut noter que l'effet toxique observé des
extraits de recombinant dans les titrages antiviraux est dû
à la présence de Triton X-100 qui fut utilisé pour la mise
en oeuvre de ce procédé d'extraction particulier).

20 Il était à présent nécessaire d'enlever l'ADN
codant pour les aminoacides de non interféron à l'extrémité
amino du polypeptide d'interféron fusionné. Ceci peut être
commodément effectué en recourant à l'emploi du plasmide
pWT 501 (voir, par exemple, la demande de brevet britannique
25 publiée n° 80 36080).

Le plasmide pWT 501 possède une longueur moléculaire
de 3805 bp (paires de bases) et sa carte de restric-
tion est illustrée par la figure 2 des dessins ci-annexés.

30 Ce plasmide peut être produit par un procédé qui
comprend la restriction du pWT 221 en utilisant Hha I, en
isolant le fragment contenant le promoteur de trp, en incu-
bant ce fragment avec de l'ADN polymérase I, en soudant le
fragment à extrémité émoussée à des liants d'Hind III, en
restreignant la matière soudée en utilisant Hind III, en
35 isolant le fragment contenant le promoteur de trp, en soudant
ce fragment au pAT 153 traité à la phosphatase alcaline
bactérienne, coupé à l'Hind III (voir, par exemple, Twigg
A.J. et Sherratt D., (1980), Nature, 283, 216-218), en
transformant le K-12 HB101 d'E. coli (génotype gal⁻, lac⁻,



ara⁻, pro⁻, arg⁻, str^r, rec A⁻, r_k⁻, M_k⁻; voir, par exemple, Boyer H.W. et Roullard - Dussoix D., J. Mol. Biol., 41, 459-472), en utilisant le plasmide résultant et en opérant une sélection pour la résistance à l'ampicilline et la

5 résistance à la tétracycline.

Un petit fragment de restriction à l'Hind III/Taq I qui contient le promoteur de trp peut être isolé à partir de ce plasmide. Le site de clivage ou scission Taq I en question est situé dans la séquence d'ADN qui correspond

10 au site de liaison de ribosome dans la région de la mARN qui code pour le polypeptide conducteur de trp, qui se manifeste juste avant le triplet méthioninique initiateur. Ce fragment peut être uni à un fragment de restriction au Sac I/Hind III

15 du gène d'interféron cloné qui contient la totalité de la séquence de codage de protéine mûre, précédée par seulement six paires de bases comme le représente le schéma I qui accompagne le présent mémoire. Etant donné que le résidu amino-terminal de l'interféron mûr se trouve être la

20 méthionine, le procédé d'union ou de soudure peut être réalisé de telle manière que l'on produise un ADN chimérique qui, lorsqu'il est transcrit, contient un site de liaison de ribosome artificiel qui utilise ce codon de méthionine comme codon initiateur pour la traduction. La molécule conjointe a ensuite été clonée en K-12 HB101 d'E. coli en utilisant

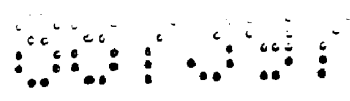
25 le pAT 153 comme vecteur de plasmide. Ce procédé est illustré sur le schéma I qui accompagne le présent mémoire.

Une autre conséquence importante du procédé ci-dessus réside dans le fait que le plasmide d'expression ainsi obtenu est dépourvu de la région atténuatrice de trp

30 qui joue un rôle important dans la régulation de la transcription de l'opéron de trp (voir, par exemple, Miozzari G.F. et Yanofsky C., (1978), J. Bacteriol., 133, 1457-1466).

Des recombinants contenant la molécule conjointe nécessaire pour chaque orientation ont ensuite été analysés

35 en ce qui concernait leur aptitude à produire de l'interféron. On a constaté qu'ils produisaient des proportions notablement supérieures, grosso modo sextuples (dans les deux orientations), d'activité antivirale extractible, lorsqu'on les comparait aux recombinants contenant le gène



d'interféron inséré dans le pWT 221. Comme prévu, le calibre de l'interféron produit (environ 19.000 daltons) est plus petit que celui obtenu en utilisant le pWT 221 comme plasmide d'expression (environ 24.000 daltons). Ceci est

5 illustré par la figure 3 des dessins ci-annexés et est raisonnablement compatible avec la nature espérée des polypeptides d'interféron produits dans les deux cas (sur la figure 3 : a = recombinant contenant molécule conjointe en orientation dextrorsum (c.à.d. que la transcription

10 se déroule depuis le promoteur de trp vers le gène de résistance à la tétracycline dans le plasmide), b = recombinant contenant molécule conjointe en orientation senestrorsum (c.à.d. que la transcription se déroule depuis le promoteur de trp en s'écartant du gène de résistance à la tétracycline),

15 c = transformant ne contenant seulement que le pAT 153, d = recombinant contenant le gène d'interféron mais dépourvu du promoteur de trp, f = recombinant d'expression constitué du gène d'interféron inséré dans pWT 221 et g = recombinant d'expression constitué du gène d'interféron inséré dans

20 pWT 211). La figure 3 annexée au présent mémoire illustre également l'abondance du polypeptide d'interféron de 19.000 daltons par rapport au produit de 24.000 daltons synthétisé dans le recombinant à pWT 221. Cet accroissement de l'expression du gène d'interféron peut être attribué à l'enlèvement

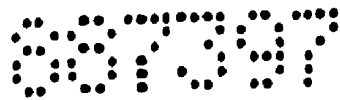
25 de la région de l'atténuateur de trp.

La séquence de liaison au ribosome artificiel contient six nucléotides entre les restes du site de clivage ou scission Taq I et le codon initiateur ATG. Le plasmide original (pWT 501) ne contient seulement que cinq nucléotides

30 (de séquence différente) dans cette région analogue (voir schéma I). Par conséquent, d'autres changements du calibre et de la séquence de cette région particulière dans le recombinant d'interféron peuvent augmenter l'efficacité de la liaison au ribosome et concomitamment améliorer le rendement

35 en polypeptide d'interféron.

Il faut s'attendre à ce que le rendement en polypeptide analogue à l'interféron puisse encore être davantage amélioré en augmentant le nombre de gènes d'interféron et/ou de promoteurs de trp dans chaque plasmide. Ceci



peut se faire par mise en oeuvre de procédés connus.

De même, l'utilisation de fermenteurs bactériens dans lesquels de fortes densités cellulaires peuvent être obtenues, accroissent manifestement le rendement en activité
5 d'interféron par litre de bactéries.

Outre son aptitude à protéger les cellules Vero contre le cpe du virus EMC, le polypeptide d'interféron produit dans des bactéries protège également des cellules de callitriche africain V3 contre une infection par le virus
10 de la stomatite vésiculaire (VSV) in vitro. En outre, comme l'interféron de fibroblaste natif, le polypeptide d'interféron bactérien s'est également avéré être capable d'augmenter l'activité léthale naturelle de lymphocytes humains in vitro.

15 La protéine analogue à l'interféron génétiquement engendrée est principalement destinée à l'usage pour le traitement de maladies et elle sera utilisée en quantités efficaces, éventuellement en combinaison avec un excipient pharmaceutiquement acceptable. Les doses utilisées au cours
20 d'études utilisant des interférons humains natifs ont considérablement varié, par exemple de 10^5 à 10^7 unités de référence internationales par jour pendant diverses périodes (voir, par exemple, Scott G.M. et Tyrell D.A.J., (1980), Brit. Med. J., 280, 1558-1562). On prévoit que le régime
25 de traitement préféré sera amené à varier en fonction du type et de la gravité de la maladie. Le polypeptide d'interféron produit à partir de bactéries peut manifester des activités différentes et des propriétés pharmacocinétiques différentes par rapport à l'interféron de fibroblaste natif
30 dans certaines circonstances.

On a également utilisé l'ADN de recombinant d'interféron pour trier des bancs de gènes humains quant à la présence de clones contenant le gène d'interféron chromosomal. On a obtenu ce dernier en extrayant d'abord le fragment de restriction à l'Hind III contenant le gène d'interféron d'un plasmide de recombinant pWT 221, en radiomarquant
35 et en hybridant ensuite à des plaques produites par la transfection de bactéries avec une collection d'hybrides de phage λ /ADN chromosomal humain. Les plaques qui lient

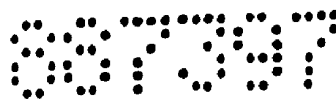


spécifiquement le gène d'interféron de sondage ont été purifiées et l'ADN de recombinant λ en a été préparé. Le gène d'interféron de fibroblaste (ou β) contenu dans ces molécules a ensuite été séquencé et la séquence est présentée dans le schéma J qui accompagne le présent mémoire.

On a observé une séquence de gène ininterrompue identique à celle illustrée dans le schéma F qui accompagne le présent mémoire, immédiatement suivie d'une séquence correspondant à la séquence de mRNA d'interféron non traduite en 3' qui a été antérieurement déterminée (voir, par exemple, Taniguchi T. et coll., (1980), *Gene*, 10, 11-15 et Derynck R. et coll., (1980), *Nature*, 285, 542-547). Cette observation indique qu'il n'existe pas de séquences interposées (introns) dans le gène d'interféron de fibroblaste particulier dans le génome.

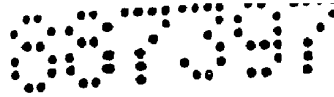
Au surplus, les courtes séquences de gène en amont et en aval du gène d'interféron ont également été déterminées. La région de flanquement en amont peut constituer une partie de la séquence d'initiation à l'ARN polymérase/promoteur qui règle la transcription du gène d'interféron dans les fibroblastes humains (voir, par exemple, Houghton M. et coll., (1981), *Nucl. Acids Res.*, 9, N° 2).

Il apparaît que les bactéries ne peuvent pas fidèlement exprimer des gènes eucaryotes contenant des introns et, de la sorte, une implication de ce qui précède réside dans le fait qu'il serait possible d'induire des bactéries pour produire des interférons humains en les transformant avec des gènes chromosomiaux codant pour l'interféron. Ces gènes chromosomiaux pourraient être isolés de bancs de gènes humains aisément disponibles et une telle solution offre des avantages par rapport à l'isolement préalable du mRNA d'interféron à partir de cellules eucaryotes induites, la synthèse du gène à cADN in vitro, la transformation de bactéries, etc. Etant donné qu'il apparaît que les gènes d'interféron ne contiennent en général pas d'introns, étant donné qu'un gène d'interféron de leucocyte en est également dépourvu (voir, par exemple, Nagata S. et coll., (1980), *Nature*, 287, 401-408), une telle solution pourrait être appliquée à divers gènes d'



interféron.

En utilisant le gène d'interféron cloné, c.à.d. le gène à cADN, comme sonde pour des séquences homologues dans l'ADN génomical total restreint avec toute une variété d'enzymes de restriction, la présence d'un type prédominant de gène d'interféron de fibroblaste pourrait être observée (voir, par exemple, Houghton M. et coll., loc cit). Cependant, il n'y avait pas de manifestation de la présence d'autres gènes qui étaient partiellement homologues à la sonde (ibid). La possibilité subsiste par conséquent que d'autres gènes d'interférons pourraient être isolés (à partir de produits de digestion soumis à restriction de l'ADN génomical total ou directement à partir de bancs de gènes chromosomiaux humains) en utilisant le présent gène d'interféron cloné particulier. Au surplus, ayant utilisé avec succès des oligonucléotides spécifiques pour déceler des recombinants bactériens contenant des gènes d'interféron (voir (11) ci-dessous), il est à présent réalisable d'utiliser des oligonucléotides choisis pour déceler et isoler différents gènes d'interféron contenus dans des bancs de gènes chromosomiaux humains ou présents dans un produit de digestion sous restriction de l'ADN génomical total. Par exemple, la présente séquence de gène d'interféron manifeste certaines similitudes avec des gènes de leucocytes humains (voir, par exemple, Taniguchi T. et coll., (1980), Nature, 285, 547, et Streuli M. et coll., (1980), Science, 209, 1343-1347). Par l'emploi d'une sonde oligonucléotidique qui est commune entre les séquences de gène d'interféron de fibroblastes et de leucocytes, il est possible d'isoler les deux types de gènes à partir d'un banc de gènes humains par exemple. De manière similaire, on pourrait obtenir d'autres gènes d'interféron partiellement homologues par l'emploi d'autres oligonucléotides homologues à différentes régions du présent gène d'interféron cloné. Une telle approche peut être plus efficace que la simple utilisation du gène d'interféron de fibroblaste cloné entier comme sonde pour les gènes partiellement homologues, en raison d'une diminution de "l'arrière-plan" au cours de telles expériences par l'utilisation d'oligonucléotides spécifiques.

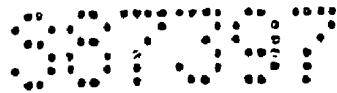


Des séquences communes entre différents gènes d'interféron indiquent qu'elles peuvent coder pour une fonction commune manifestée par les divers polypeptides d'interféron. Par conséquent, la séquence de gène codant pour les 50-60 aminoacides approximativement à l'extrémité carboxyle de la molécule, peut être d'une importance particulière et il faut comprendre que le produit d'un recombinant contenant un tel sous-gène ou une partie de celui-ci peut être d'une valeur particulière. De manière similaire, d'autres sous-gènes (qu'ils présentent une certaine homologie avec d'autres séquences de gène d'interféron ou non) peuvent également être d'une valeur particulière.

Il faut également comprendre que la séquence de gène d'interféron de fibroblaste peut être limitée quant à l'expression dans des bactéries en raison de l'emploi de codons qui peuvent être peu fréquemment utilisés dans des molécules de mARN bactérien. Par conséquent, il est clair qu'en changeant certains codons de gène d'interféron, en manière telle qu'ils continueront encore d'encoder le même aminoacide, mais qu'ils seront plus efficacement traduits par l'appareil de traduction bactérien, on peut améliorer le rendement global en interféron. La logique mise en oeuvre pour décider quels sont les codons, s'il y en a, qui tireraient bénéfice de l'ajustement, peut être basée sur l'usage de codon observé dans des molécules de mARN procaryotes (voir, par exemple, Grantham R. et coll., loc cit).

De même, il faut bien comprendre que le clonage du gène d'interféron contenant additionnellement l'ADN pour la séquence de signal prépeptidique peut entraîner un certain avantage. Par exemple, l'interféron produit peut être séquestré dans l'espace périplasmique, éventuellement après clivage ou scission de la séquence de signal. Au surplus, la conformation de l'interféron polypeptidique peut être plus similaire à l'état naturel, en comparaison de celui obtenu par l'expression directe de la séquence de gène ne codant seulement que pour l'interféron mûr. Par conséquent, l'activité de l'interféron produit peut être supérieure.

D'autres techniques de production de l'interféron par fabrication génétique comprennent l'introduction du gène



d'interféron nécessaire dans des cellules eucaryotes, par exemple des cellules L de souris ou des cellules de levure.

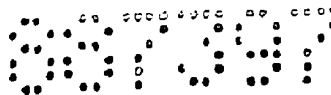
On peut transformer des cellules L de souris avec de l'ADN exogène et ceci peut s'effectuer avec des gènes d'interféron humain selon un certain nombre de manières différentes. Par exemple, un gène d'interféron chromosomal contenant la totalité de la séquence à ADN nécessaire à l'initiation correcte par l'ARN polymérase pourrait être cloné dans les cellules de souris, de manière à permettre ainsi la transcription et l'expression subséquente. En alternative, un gène d'interféron dépourvu de cette séquence de promoteur pourrait être soudé à un autre morceau d'ADN eucaryote contenant un promoteur, par exemple le gène de thymidine kinase que l'on utilise comme base pour la sélection du transformant (voir, par exemple, Wigler M. et coll., (1979), Cell, 16, 777-785). De cette manière, la transcription du gène d'interféron se déroulerait par l'intermédiaire de la séquence de gène soudée ou liée.

Il est également possible que la transformation de cellules L avec un gène d'interféron dépourvu d'une séquence de promoteur puisse encore entraîner l'expression de l'ADN, en raison de l'insertion fortuite dans des régions particulières du génome.

Certains plasmides habitent aussi des cellules de levure et des gènes d'interféron pourraient être introduits dans de tels plasmides ou des versions convenablement modifiées de ces plasmides, de façon à obtenir l'expression de l'ADN hétérologue et le rendement en polypeptide d'interféron.

Il est possible que l'interféron produit par mise en oeuvre de tels procédés puisse être d'une efficacité et d'une activité biologique supérieures à celles de l'interféron produit dans des procaryotes où certaines modifications importantes ne peuvent pas être apportées à la protéine eucaryote. Le rendement en interféron peut également être supérieur dans ces systèmes eucaryotes.

Par conséquent, selon une première de ses formes de réalisation, la présente invention a pour objet un gène pour l'expression d'une protéine possédant des propriétés



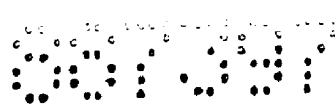
ressemblant à celles de l'interféron humain, caractérisé en ce qu'il comprend un brin codeur et un brin complémentaire, le brin codeur comprenant la séquence :

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
 5 TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
 GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
 GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-
 TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
 TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
 10 TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
 AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
 GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
 CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
 15 GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
 AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
 TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
 ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.-
 20 CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.-
 ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.-
 TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.-
 ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.-
 TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.-
 25 ACA.TGG.CA 3'

ou une sous-unité ou un équivalent de ce gène.

(Il faut comprendre que ce que l'on appelle "brin codeur" a le même sens que le mARN).

30 Ce qui figure ci-dessus correspond à la séquence codant l'mARN entière, plus les séquences de gène



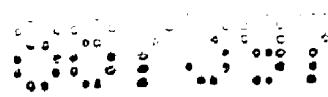
en amont et en aval, obtenues en isolant le gène d'un banc de gènes chromosomiaux et en procédant à une séquentialisation.

5 Selon une autre de ses formes de réalisation, la présente invention a pour objet un gène dont le brin codeur comprend la séquence qui suit :

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
 TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
 GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
 10 GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-
 TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
 TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
 TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
 AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
 15 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
 GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
 CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
 GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
 AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
 20 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
 TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
 ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
 AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.-
 CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.-
 25 ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.-
 AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.-
 AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.-
 TTT.CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.AAC.CA..3'

ou une sous-unité ou un équivalent de ce gène.

30 Ceci correspond à la séquence qui a été décrite plus haut avec une certaine séquence aval supplémentaire.



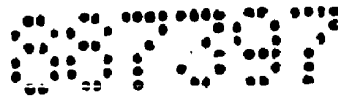
La présente invention a également pour objet un gène dont le brin codeur comprend la séquence qui suit :

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.-
 CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.-
 5 GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.GTC.-
 CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.-
 CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.-
 AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.-
 AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAT.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.-
 10 TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.-
 CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.-
 CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.-
 ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.-
 AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.-
 15 GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.-
 CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.-
 GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.-
 TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.-
 20 AGA.TCT.CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.-
 TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.CCT.GTT.TAA.GTG.ACT.-
 GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.-
 TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.-
 TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.-
 25 AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.-
 AAC.CA.. 3'

ou une sous-unité de ce gène.

Ceci constitue une forme polymorphe de la séquence décrite plus haut.

30 Certaines parties particulières de tels gènes constituent également des formes de réalisation de la



présente invention.

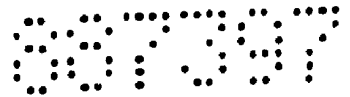
Par conséquent, selon l'une de ses formes de réalisation particulières, la présente invention a pour objet un gène dont le brin codeur comprend la séquence qui suit :

5
 10
 15
 20
 25

5' TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.-
 CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG-
 ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.-
 TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.-
 GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.-
 CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.-
 AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.-
 CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.-
 CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.-
 GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.-
 CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.-
 TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.-
 AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.-
 GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.-
 ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.-
 TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.-
 GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.-
 GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.-
 AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.-
 GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.-
 TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TC 3'

ou un équivalent de ce gène.

30 Avec l'addition éventuelle d'un ou deux restes ou résidus A à l'extrémité 3', ceci constitue la séquence de gène correspondant à la séquence de mARN entière.



Selon une autre de ses formes de réalisation particulières, la présente invention a pour objet un gène dont le brin codeur comprend la séquence qui suit :

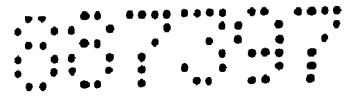
5' ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.-
 5 TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.-
 CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.-
 AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.-
 CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
 AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.-
 10 ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.-
 AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.-
 GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.-
 CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.-
 GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.-
 15 AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.-
 AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.-
 GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.-
 GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA. 3'

ou un équivalent de ce gène.

20 Ceci correspond à la séquence de gène codant pour le prépeptide et la protéine mûre.

La présente invention a également pour objet un gène dont le brin codeur comprend la séquence qui suit :

25 5' ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.-
 AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.-
 GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.-
 GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.-
 AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.-
 30 AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.-
 GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.-



GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.-
 GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.-
 ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.-
 CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
 5 TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.-
 TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA. 3'
 ou un équivalent de ce gène.

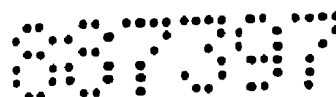
Ceci correspond à la séquence de gène codant pour la protéine mûre.

10 Les sous-unités de ces gènes constituent également des formes de réalisation de la présente invention.

L'invention concerne également un procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de ce gène ou d'une sous-unité de ce gène, conforme à l'une quelconque des trois premières formes de réalisation susmentionnées de l'invention, caractérisé en ce que l'on utilise, comme sonde, une molécule possédant une séquence d'un gène ou d'un équivalent de ce gène ou d'une sous-unité de ce gène conforme à l'une quelconque des autres formes de réalisation susmentionnées de l'invention, afin d'isoler de l'ADN chromosomal humain un gène d'interféron chromosomal humain.

20 Il faut comprendre que bien que l'on puisse initialement utiliser de l'ADN monocaténaire ou bicaténaire comme sonde, un brin monocaténaire sera présent à l'étape d'hybridation.

25 La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de ce gène ou d'une sous-unité de celui-ci, conforme à l'une quelconque des formes de réalisation susmentionnées de l'invention, autres que les trois premières, caractérisé en ce que l'on isole le polyA-mARN de cellules de fibroblastes induites, on synthétise du cADN monocaténaire en utilisant un oligo dT amorceur et on en synthétise de l'ADN bicaténaire en utilisant de la transcriptase réverse ou de l'ADN polymérase I de E. coli et éventuellement un amorceur.



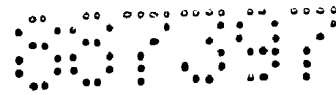
Il est préférable d'utiliser un amorceur au cours de la troisième étape de ce procédé. De manière générale, on fractionne le mélange réactionnel après la seconde étape et/ou après la troisième étape. On inhibe de préférence l'autoamorçage après la seconde étape. On peut identifier le produit, après clonage, en utilisant un amorceur pour trier les colonies.

La présente invention concerne aussi un procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de ce gène ou d'une sous-unité de celui-ci, conforme à l'une quelconque des formes de réalisation susmentionnées de l'invention, autre que les trois premières, caractérisé en ce que l'on isole le mARN de cellules de fibroblastes induites, on synthétise du cADN monocaténaire en utilisant un amorceur spécifique et de la transcriptase réverse et on en synthétise de l'ADN bicaténaire en utilisant de la transcriptase réverse ou de l'ADN polymérase I de E. coli et éventuellement un amorceur.

On peut considérer que ceci constitue une variante du procédé susmentionné.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de gène ou d'une sous-unité de celui-ci qui possède une partie commune à ou apparentée à une partie d'un gène ou d'un équivalent de ce gène ou d'une sous-unité de celui-ci, conforme à l'une quelconque des trois premières formes de réalisation susmentionnées de l'invention, caractérisé en ce que l'on utilise, comme sonde, une molécule possédant une séquence correspondant à au moins une partie d'une fraction commune ou apparentée, afin d'isoler un gène chromosomal humain à partir de l'ADN chromosomal humain.

La présente invention concerne également un recombinant de plasmide, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur de plasmide dans lequel est inséré, à un site d'insertion, un gène ou une sous-unité de ce gène ou un équivalent de celui-ci, le recombinant de plasmide permettant la traduction dans la phase correcte pour le mARN correspondant au gène ou à la sous-unité de ce gène ou à l'équivalent de ce gène inséré et possédant un promoteur

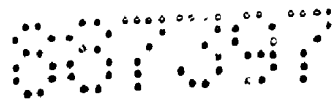


bactérien en amont de et adjacent au site d'insertion, de telle façon que le gène ou la sous-unité de ce gène ou l'équivalent de ce gène inséré se trouve sous contrôle d'un promoteur bactérien. Il peut être considéré comme avantageux d'insérer une multiplicité de fragments d'ADN. De manière similaire, on peut trouver souhaitable d'utiliser une multiplicité de promoteurs bactériens. Il est particulièrement avantageux d'utiliser un recombinant de plasmide qui est dépourvu d'au moins une partie de la séquence d'ADN responsable de l'atténuation de la transcription. Un exemple particulier d'un recombinant de plasmide préféré comprend un dérivé modifié de pWT 501. Dans certaines circonstances, on peut tirer bénéfice du fait que l'ADN inséré code également pour un codon d'initiation et/ou au moins une partie d'un site de liaison ou soudure de ribosome.

La production d'un tel recombinant de plasmide par mise en oeuvre d'un procédé caractérisé en ce que l'on insère l'ADN au site d'insertion d'un vecteur de plasmide approprié constitue également une forme de réalisation de la présente invention.

Dans un cas particulier, un tel procédé peut comprendre l'isolement d'un fragment d'Hind III d'environ 150 bp contenant un promoteur de trp à partir du pWT 501, l'autosoudure, la digestion partielle avec du Taq I, le traitement par de la S1 nuclease, le traitement par de l'ADN polymérase I de E. coli, la restriction avec Hind III, l'isolement d'un fragment d'environ 100 bp contenant le promoteur de trp, la soudure à un fragment d'environ 700 bp obtenu en traitant un plasmide recombinant de pWT 231 contenant le gène ou une sous-unité de ce gène ou un équivalent de ce gène par du Sac I, de la S1 nucléase, de l'ADN polymérase I de E. coli et de l'Hind III, la restriction avec l'Hind III et la soudure au pAT 153 traité par une phosphatase alcaline bactérienne, ayant subi une restriction à l'Hind III.

La présente invention a également pour objet une cellule caractérisée en ce qu'elle comporte à l'état inséré, un gène tel que décrit plus haut ou une sous-unité de ce gène ou un équivalent de celui-ci, ou un recombinant de



plasmide tel que décrit plus haut.

Dans le cas préféré, la cellule est une cellule K-12 HB 101 d'E. coli.

La production d'une telle cellule par mise en oeuvre d'un procédé caractérisé en ce que l'on insère l'ADN ou le recombinant de plasmide dans une cellule constitue également une forme de réalisation de la présente invention.

Selon une autre de ses formes de réalisation, la présente invention a pour objet un procédé de production d'une protéine possédant des propriétés qui ressemblent à celles de l'interféron humain, caractérisé en ce que l'on cultive une cellule du genre susmentionné et on récupère la protéine exprimée.

On donne ci-dessous des formes de réalisation illustratives et non limitatives de la présente invention.

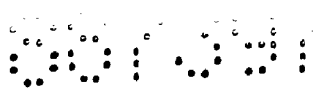
(1) Synthèse des oligodésoxynucléotides

Les six oligonucléotides, CpApGpGpTpTpGpTpApGpCpTpCpApT (IFIA), CpApGpGpTpTpGpTpApApCpTpCpApT (IFIB), CpTpCpTpTpTpCpCpApTpG (IFII), CpApGpCpTpCpTpTpTpCpCpApTpG (IFIII), GpApGpGpApGpApTpTpApApG (IFIV) et CpCpTpGpGpApApGpApApA (IFV) ont été synthétisés par une méthodologie au triester classique (voir, par exemple, Hsiung H.M. et coll., (1979), Nucl. Acids Res., 6, 1371-1385) et conformément au schéma réactionnel représenté sur la figure 4 des dessins ci-annexés où N représente G^{isobu}, T, C^{bz} ou A^{bz}.

On a débloqué les oligonucléotides totalement protégés avec de l'acide benzènesulfonique à 2 % (p/v), du fluorure de tétraéthylammonium 0,1 M dans un mélange de tétrahydrofuranne (THF)/pyridine/H₂O (8/1/1 en volume), cette opération étant suivie du traitement par de l'ammoniac. On a purifié les oligonucléotides débloqués par une chromatographie en phase liquide sous pression élevée (HPLC) sur de la silice microparticulaire "Partisil 10 SAX" que l'on a soumise à une dérivation avec des groupes ammonium quaternaire (Whatman).

(2) Phosphorylation des oligonucléotides

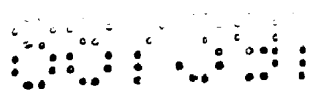
On a incubé chaque oligonucléotide synthétique (120 pmoles) avec 200 pmoles de 5'-(γ -³²P) ATP (Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, Angleterre; activité



spécifique >5000 Ci/m mole) et 3 unités de polynucléotide kinase (EC 2.7.1.78), (1 unité est la quantité qui catalyse la production de 1 nmole de ^{32}P insoluble dans l'acide après incubation pendant 30 minutes à 37°C selon Richardson C.C., (1972), Progress in Nucleic Acids Research, 2, 815), dans un volume total de 20 μl contenant 50 mM de Tris-HCl (chlorhydrate de tris (hydroxyméthyl) aminométhane) pH 9,0, 10 mM de Mg Cl_2 , 0,1 mM d'EDTA (sel disodique de l'acide éthylène-diaminetétra-acétique), 0,1 mM de spermidine et 1 mM de dithiothréitol (DTT). Après 60 minutes à 37°C, lorsque la plupart des molécules de l'amorceur furent marquées, on a soit dilué le mélange jusqu'à 200 μl et on l'a ajusté à 1 % (p/v) de dodécylsulfate de sodium (SDS) et à 10 mM d'EDTA et, étant donné que peu d'oligonucléotide était présent, à 5 $\mu\text{g/ml}$ de tARN de levure, secoué avec un égal volume de phénol saturé d'eau et secoué de nouveau après l'addition du même volume de chloroforme, centrifugé (10.000 x g; 2 minutes) et extrait la phase aqueuse résultante comme décrit ci-dessus, que l'on a ensuite extraite à deux reprises avec un égal volume de chloroforme et ensuite concentrée par précipitation à l'éthanol (ce qui a impliqué l'ajustement de la concentration en NaCl à 200 mM, l'addition de 2,5 volumes d'éthanol absolu et le repos jusqu'au lendemain à -20°C), (IFIA et IB), soit simplement chauffé à 100°C pendant 5 minutes (IFII, III, IV et V).

(3) Isolement de poly A - mARN

Des bouteilles montées sur des rouleaux 20 l de fibroblastes humains (FS-4) (provenant de cellules de prépuce humain) ou 17/1 (provenant de cellules de poumons d'embryons humains) ont été amorcées jusqu'au lendemain à l'aide d'interféron homologue (60 unités de référence internationales/ml) avant d'être superinduites pendant 5 heures avec du poly(I):poly(C), (30 $\mu\text{g/ml}$) et du cycloheximide, (2 $\mu\text{g/ml}$). Des cellules faussement induites n'ont pas reçu de poly(I):poly(C). On a enlevé les cellules de la surface de verre par un bref traitement à l'aide d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) contenant 1,25 mg/ml de trypsine (EC 3.4.4.4), 0,5 mg/ml d'EDTA,



2 µg/ml de cycloheximide et on les a récoltées dans un milieu R.P.M.I. 1640 (modification de Searle, Flow Laboratories) glacé contenant 2 µg/ml de cycloheximide et 10 % (v/v) de sérum de veau. Après avoir rapidement lavé les culots (1.000 x g, 5 minutes) avec du R.P.M.I. 1640 contenant 2 µg/ml de cycloheximide, on a lysé les cellules par homogénéisation dans du Tris-HCl 0,2 M, pH 9, du NaCl 50 mM, de l'EDTA 10 mM, du SDS 0,5 % (p/v), 1 mg/ml d'héparine et on les a ensuite déprotéinisées à l'aide d'un égal volume de phénol équilibré dans le tampon susmentionné (sans héparine), cette opération étant suivie de trois extractions avec un égal volume d'un mélange de CHCl₃ et de phénol tamponné (1:1 v/v). Après la précipitation à l'éthanol et la dissolution, on a sélectivement précipité l'ARN avec du NaCl 3M et on a isolé le mARN polyadénylé par chromatographie à l'oligo (dT) - cellulose (voir, par exemple, Aviv H. et Leder P., (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1408-1412).

(4) Transcription réverse du mARN de fibroblaste en utilisant IFIA et IB

On a incubé 75 pmoles de 5'-oligonucléotide (IFIA ou IB) marqué au (³²P) avec 22,5 µg de mARN de fibroblaste contenant du poly(A) à 25°C pendant 1 heure dans 36 µl de KCl 0,4 M, de manière à permettre à l'amorceur de s'hybrider à la séquence complémentaire dans le mARN.

On a ensuite dilué le produit ainsi obtenu avec un mélange de transcription de façon à obtenir une solution finale contenant 0,5 mM de chacun de dATP, dCTP, dGTP et dTTP, 50 mM de Tris-HCl, pH 8, 4 mM de MgCl₂, 60 mM de KCl, 5 mM de DTT, 0,01 % (v/v) de Triton X-100 (détergent non ionique, isoocetylphénoxy polyéthoxyéthanol), 0,22 µM de IFIA ou IB, 50 µg/ml d'actinomycine D, 67 µg/ml de polyA-mARN, 20 unités/ml d'inhibiteur de ribonucléase de foie de rat (1 unité est la quantité qui donne une inhibition de 50 % de 5 ng de ribonucléase pancréatique selon Shortman K., (1961), Biochim. Biophys. Acta, 51, 37), (voir, par exemple, Gribnau A.A.M. et coll., (1969), Arch. Biochem. Biophys., 130, 48-52) et 100 unités/ml d'AMV (virus de la myéloblastose aviaire) de transcriptase réverse (1 unité est la quantité



qui incorpore 1 n mole de dTMP dans le produit précipitable à l'acide après incubation pendant 10 minutes à 37°C selon Houts G.E. et coll., (1979), J. Virol., 29, 517). On a poursuivi l'incubation pendant 60 minutes à 37°C et on a ensuite
 5 extrait le mélange par du phénol et du chloroforme et on l'a concentré par précipitation à l'éthanol (voir (2) ci-dessus).

(5) Analyse des produits de la transcription réverse obtenus avec IFIA et IB

On a dissous les produits précipités à l'éthanol
 10 dans de l'eau et on les a incubés en présence de NaOH 0,1 M et d'EDTA 1 mM à 37°C pendant 30 minutes. On a ensuite ajouté un égal volume d'urée 10 M, de saccharose 25 % (p/v), de xylène cyanol et de bleu de bromophénol, chacun 0,05 % (p/v) et on a ensuite chauffé le mélange à 90°C pendant
 15 90 secondes avant de l'appliquer à de l'urée 7M contenant du gel de polyacrylamide (12,5 % p/v) (voir, par exemple, Maxam A. et Gilbert W., (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560-564). Après l'électrophorèse, on a autographié le gel afin de localiser la position des molécules marquées.
 20 Le produit marqué d'environ 150 nucléotides et produit uniquement par du mARN à partir de cellules induites, a ensuite été élué de la tranche de gel et on a déterminé sa séquence (voir, par exemple, Maxam et Gilbert, loc cit). La séquence est illustrée par le schéma B qui accompagne le présent
 25 mémoire.

(6) Préparation du cADN à partir de polyA-mARN de fibroblastes

On a préparé le cADN en incubant le mélange
 suivant à 37°C pendant 2 heures : 0,5 mM de dCTP, de dGTP, de
 30 dTTP, 0,15 mM de (³H) dATP (167 mCi/mole), 5 mM de DTT, 50 mM de Tris-HCl, pH 8, 10 mM de MgCl₂, 0,01 % (v/v) de Triton X-100, 50 µg/ml d'actinomycine D, 20 unités/ml d'inhibiteur de ribonucléase de foie de rat, 50 mM de KCl, 20 µg/ml d'oligo-(dT)₁₂₋₁₈, 60 µg/ml de polyA-mARN et
 35. 100 unités/ml d'AMV de transcriptase réverse. Après l'incubation, on a extrait le mélange à l'aide de phénol et de chloroforme et on l'a précipité à l'éthanol (voir (2) ci-dessus). On a récupéré l'ADN par centrifugation, on l'a séché et dissous dans 200 µl de NaOH 0,3 N. Après incubation pendant



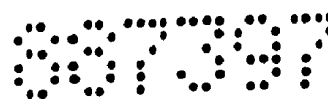
1 heure à 50°C, on l'a neutralisé et élué sous forme du pic exclu d'une colonne de G50 (M) Sephadex, polymère de dextrane modifié, réticulé, particulaire (Pharmacia) (25 x 0,5 cm), équilibrée dans du NaCl 50 mM/SDS 0,1 % (p/v). On a rassemblé les fractions du pic et on les a concentrées par précipitation à l'éthanol.

(7) Transcription de cADN avec des oligonucléotides IFII, III, IV et V

On a préincubé le 5'-oligonucléotide marqué au (³²P) (3 μM) avec du cADN monocaténaire total (440 μg/ml), dérivé de polyA-mARN total pendant 2 heures à 25°C, en présence de KCl 0,4 M. On a ensuite incubé le produit obtenu à 37°C pendant 3 heures dans une solution finale contenant alors 0,01 % (v/v) de Triton X-100, 50 mM de Tris-HCl, pH 8, 20 mM de DTT, 10 mM d'acétate de magnésium, 0,5 mM de chacun de dATP, dCTP, dGTP et dTTP, 80 mM de KCl, 1.000 unités/ml de transcriptase réverse d'AMV du 5'-oligonucléotide marqué au (³²P) (0,12 μM) et du cADN monocaténaire (17,6 μg/ml). Après l'extraction par du phénol et du chloroforme, on a fait passer la phase aqueuse à travers une colonne de G50 (M) Sephadex dans du NaCl 50 mM, du SDS 0,1 % (p/v) et on a précipité la fraction exclue à l'aide d'éthanol, on l'a dissoute et on l'a soumise à une électrophorèse.

(8) Analyse de transcrits produits par IFII, III, IV et V

On a traité les transcrits de la manière décrite plus haut, c.à.d. pour des transcrits produits par IFIA et IB à l'exception de l'emploi d'un gel de polyacrylamide à 5 % (p/v) dans de l'urée 7M, ou bien on les a préparés et soumis à une électrophorèse à travers des gels d'agarose (1,4 % p/v) natifs (voir, par exemple, Sharp P.A. et coll., (1973), Biochemistry, 12, 3055-3063), que l'on a ensuite autoradiographiés. On a ensuite élué les gènes d'interféron à partir de tranches de gel d'agarose choisies d'abord par passage à travers une aiguille de seringue 19G, puis une aiguille de seringue 21G (Gillette) et agitation des fragments de gel pendant 3 heures à 25°C dans de l'Hépes 10 mM, de l'acide N-2-hydroxy-éthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique (Ultrol), pH 7, de l'EDTA 0,1 mM et du Triton X-100 (0,02 % - v/v).



Après centrifugation (700 x g, 5 minutes) à travers un tampon de laine de verre posé sur un papier filtre GF/C et GF/B (Whatman), on a extrait le filtrat au phénol et au chloroforme et on l'a ensuite précipité à l'éthanol.

5 On a ensuite séquencé l'ADN comme mentionné plus haut.

(9) Préparation de gènes d'interféron pour le clonage

(a) Production de cADN monocaténaire à partir de polyA-mARN total isolé de fibroblastes induits :

10 On a synthétisé le cADN dans un milieu d'incubation de 20 ml contenant les constituants décrits plus haut (6). Après l'extraction à l'aide de phénol et de chloroforme, on a chromatographié la phase aqueuse sur une colonne de Sephadex G50 (M) (28 x 4 cm) à partir de laquelle on a
15 élué le cADN dans la fraction exclue dans du NaCl 50 mM, SDS 0,1 % (p/v). On a précipité le cADN avec de l'éthanol et on l'a ensuite récupéré, dissous dans 0,4 ml de NaOH 0,2 N et on l'a incubé à 50°C pendant 30 minutes avant d'être centrifugé à travers un gradient de saccharose alcalin
20 comme décrit ci-dessous.

(b) Purification du cADN monocaténaire d'interféron :

On a divisé le cADN ci-dessus en deux parties égales et on a centrifugé chaque partie à 36.000 tpm à 2°C pendant 24 heures dans un rotor SW 41 de Beckmann, à travers
25 un gradient de saccharose isocinétique (5-20 % p/p) (11 ml) contenant du NaOH 0,2 N, du NaCl 100 mM et de l'EDTA 10 mM. On a recueilli des fractions de 0,5 ml par déplacement ascendant en utilisant du saccharose (50 %, p/v) et on a rassemblé les fractions correspondantes des deux gradients,
30 on les a neutralisées et précipitées à l'aide d'éthanol absolu. On a recueilli les précipités par centrifugation, on les a lavés dans de l'éthanol absolu et on les a ensuite dissous dans 100 µl d'H₂O. On a identifié les fractions contenant des transcrits de cADN d'interféron par analyse des
35 produits obtenus après l'amorçage de petites parties aliquotes de chaque fraction à l'aide de (³²P) IFIII et de transcriptase réverse, de la manière décrite plus haut (7) et (8). On a rassemblé les fractions principales qui avaient donné lieu à la synthèse d'une molécule d'ADN d'interféron d'une

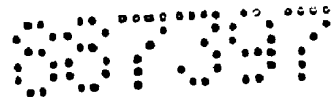
longueur d'environ 700 nucléotides dans une préparation pour une synthèse à grande échelle de gènes d'interféron à double brin.

5 (c) Inhibition de l'activité autoamorçante du cADN monocaténaire d'interféron purifié :

Avant de procéder à une préparation à grande échelle de gènes d'interféron à double brin, on a réduit l'activité autoamorçante du cADN monocaténaire d'interféron purifié (lorsqu'il était subséquentement incubé avec de la
10 transcriptase réverse) en incubant le cADN à 37°C pendant 3 heures dans 1,5 ml d'un milieu contenant du cacodylate de sodium 150 mM, pH 7,2 , du 2-mercaptoéthanol 1 mM, du CoCl_2 1 mM, 100 $\mu\text{g/ml}$ de gélatine, 20 $\mu\text{g/ml}$ de cADN, du rATP 1,2 mM et 600 unités/ml de transférase terminale (EC 2.7.7.31)
15 (1 unité est la quantité qui incorpore 1 n mole de dATP dans le produit précipitable à l'acide en l'espace d'une heure à 37°C en utilisant du d(pA)_{50} comme amorceur, selon Bollum R.J. et coll., (1974), Methods in Enzymology, 29, 70).

20 Après l'extraction à l'aide de phénol et de chloroforme, réalisée de la manière décrite plus haut, on a rendu la phase aqueuse 0,3 normale en NaOH et on l'a incubée pendant 1 heure à 50°C. On a ensuite neutralisé le mélange et on l'a chromatographié sur une colonne
25 Sephadex G50 (moyen) (20 x 2 cm) et on a élué le cADN dans la fraction exclue dans du NaCl 50 mM, SDS (0,1 % - p/v). On l'a ensuite précipité à l'aide d'éthanol et redissous dans de $\text{l'H}_2\text{O}$.

Le résultat de la mise en oeuvre de ce procédé
30 réside dans l'addition d'un reste d'AMP simple à l'extrémité 3'-hydroxyle du cADN. Le traitement à l'alcali engendre également un mélange de restes 2' et 3' phosphate à cette extrémité qui ne peut plus prendre part à une réaction d'autoamorçage avec de la transcriptase réverse. Par consé-
35 quent, lorsque des gènes bicaténaires sont subséquentement préparés en utilisant un oligonucléotide pour amorcer la transcription spécifique sur le cADN monocaténaire, la proportion de produits autoamorçés contaminants est réduite et le cADN monocaténaire résiduel peut subséquentement être



dégradé par la S1 nucléase (EC 3.1.4.21).

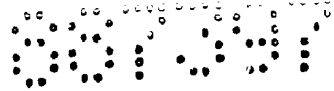
On peut également très fortement inhiber l'activité autoamorçante par la préincubation du cADN dans des mélanges tampons appropriés avec de la transcriptase réverse
 5 ou de la transcriptase terminale, en présence des quatre didésoxynucléosides triphosphates. On peut aussi incuber le cADN avec la transférase terminale et le désoxyadénosine triphosphate, de manière à produire une queue de poly(dA) à l'extrémité 3'-hydroxyle, ce qui inhibe également efficace-
 10 ment l'activité autoamorçante.

(d) Synthèse de gènes d'interféron bicaténares en utilisant du IFIII comme amorceur :

On a purifié le cADN monocaténaire d'interféron par centrifugation à travers un gradient de saccharose
 15 alcalin et on a réduit son activité autoamorçante de la manière décrite plus haut. On a ensuite préincubé 20 µg de cette matière à 25°C pendant 2 heures dans 0,36 ml contenant du KCl 0,4 M et 575 pmoles de IFIII que l'on avait préalablement incubé avec de la polynucléotide kinase
 20 (EC 2.7.1.78) et du (γ -³²P) ATP, également de la manière décrite plus haut. On a ensuite produit des gènes bicaténares par incubation plus poussée à 37°C pendant 3 heures dans 1,8 ml de milieu contenant alors du Triton X-100 (0,01 % - v/v), du Tris-HCl (50 mM), pH 8, du DTT (20 mM),
 25 de l'acétate de magnésium (10 mM), du dATP, du dCTP, du dGTP et du dTTP (0,5 mM), de la transcriptase réverse (1.000 unités/ml), du KCl (80 mM), du cADN (11,1 µg/ml) et du (³²P) IFIII (0,32 µM). Après concentration à l'aide de phénol et de chloroforme, on a élué les gènes à partir d'une
 30 colonne de Sephadex G50 (moyen) (20 x 2 cm) dans du NaCl 50 mM, SDS (0,1 % p/v). On a ajouté du tARN de levure comme véhicule (3 µg/ml) et on a ajusté la concentration du NaCl à 0,2 M avant de procéder à la précipitation avec
 35 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après repos à -70°C pendant 30 minutes, on a recueilli le précipité par filtration et on a redissous le culot séché dans 100 µl d'²H₂O.

(e) Purification de gènes d'interféron à double brin :

On a sédimenté l'ADN à travers un gradient de saccharose linéaire (5-20 % p/p) contenant du Tris-HCl



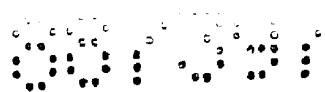
(10 mM), pH 7,5 , du NaCl (0,8 M) et de l'EDTA (8 mM).
 On a centrifugé un gradient de 5,2 ml dans un rotor SW 65
 de Beckmann à 42.000 tpm pendant 18 heures à 2°C, puis on
 a recueilli des fractions de 0,2 ml du produit et on les a
 5 précipitées à l'éthanol. On a recueilli l'ADN par centrifu-
 gation, on l'a redissous et on en a ensuite soumis de peti-
 tes parties aliquotes à une électrophorèse à travers de l'
 urée 7M contenant du gel de polyacrylamide (5 % p/v) et
 on a ensuite passé à l'autoradiographie du produit.
 10 On a rassemblé les fractions présentant la molécule d'ADN
 d'interféron de 700 nucléotides.

(f) Préparation de gènes d'interféron contenant des
 liants d'Hind III à leurs extrémités :

On a d'abord traité les fractions de gradients
 15 rassemblées susmentionnées par de la S1 nucléase par incu-
 bation à 37°C pendant 30 minutes dans 50 µl d'un milieu
 contenant du ZnSO₄ 0,1 mM, du NaCl 150 mM, de l'acétate de
 sodium 25 mM, pH 4,6 et 120 unités/ml de S1 nucléase (1 uni-
 té est la quantité qui solubilise 10 µg d'acide nucléique
 20 en 10 minutes à 45°C selon Vogt V.M., (1973), Eur. J.
 Biochem., 33, 192).

Après l'addition de 0,5 µl de SDS à 10 % (p/v),
 de 1 µl d'EDTA 0,5 M et de 1 µl de Tris-HCl 0,5 M, pH 8,3 ,
 on a extrait le mélange avec du phénol et du chloroforme et
 25 on a précipité la phase aqueuse à l'aide d'éthanol. A ce
 stade, on a obtenu un total de 0,24 µg d'ADN bicaténaire.

Afin de garantir la présence d'extrémités
 "émoussées" pour la soudure subséquente avec des molécules
 de liant d'Hind III, on a récupéré l'ADN à partir d'éthanol
 30 et on l'a incubé pendant 20 minutes à 14°C dans 50 µl d'un
 milieu contenant du Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 , du MgCl₂ 10 mM,
 du 2-mercaptoéthanol 1 mM, du dATP 0,2 mM, du dCTP 0,2 mM,
 du dGTP 0,2 mM et du dTTP 0,2 mM et 40 unités/ml d'ADN
 polymérase I d'E. coli (EC 2.7.7.7) (1 unité est la quantité
 35 qui incorpore 10 n moles de nucléotides totaux dans une
 fraction précipitable à l'acide, en l'espace de 30 minutes,
 à 37°C, en utilisant du poly-d(A-T) comme amorceur, selon
 Richardson C.C. et coll., (1964), J. Biol. Chem., 239, 222).
 On a ensuite extrait l'ADN de la manière habituelle, on l'a



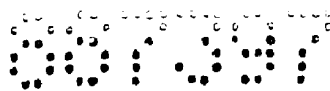
précipité à l'éthanol et on a ensuite séché le culot obtenu par centrifugation.

On a phosphorylé 2,5 µg de liant d'Hind III (Collaborative Research) d'abord par incubation à 37°C pendant 30 minutes dans 50 µl d'un milieu contenant 50 mM de Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de 2-mercaptoéthanol, 0,25 mM de (γ-³²P) ATP (20 mCi/µmole), 50 µg/ml de BSA (albumine de sérum bovin) et 100 unités/ml de polynucléotide kinase. Pour garantir une phosphorylation complète, on a incubé le mélange pendant 30 minutes supplémentaires à 37°C après l'addition de 10 µl d'un milieu contenant 50 mM de Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM de MgCl₂, 3,75 mM de rATP et 500 unités/ml de polynucléotide kinase. On a ensuite extrait le mélange avec du phénol et du chloroforme et on l'a précipité avec de l'éthanol après l'addition de tARN de levure jusqu'à 10 µg/ml.

La soudure des liants d'Hind III phosphorylés aux gènes d'interféron a été réalisée en dissolvant le culot de gène d'interféron dans 40 µl d'un milieu contenant du Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, du MgCl₂ 10 mM, du rATP 1 mM, du DTT 20 mM, 20 µg/ml de liant phosphorylé et ~ 480 unités/ml de T4 ADN ligase (EC 6.5.1.1) (1 unité est la quantité qui catalyse la conversion de 1 n mole de ³²PP_i en (α/β ³²P)-ATP en 20 minutes à 37°C selon Weiss B. et coll., (1968), J. Biol. Chem., 243, 4543). On a ensuite incubé ce produit à 25°C pendant 16 heures.

Ces conditions ont engendré un excès environ centuple de liant par rapport à l'ADN.

Après le chauffage du mélange à 65°C pendant 5 minutes, on a restreint l'ADN à l'aide d'Hind III par l'addition de 60 µl d'un mélange contenant 400 unités/ml d'Hind III (EC 3.1.23.21), (1 unité est la quantité qui digère 1 µg de λ-ADN en 15 minutes à 37°C dans 50 µl), 3 mM de DTT, 167 µg/ml de gélatine, 83 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 83 mM de NaCl, 17 mM de MgCl₂ et 8 mM de 2-mercaptoéthanol. Après l'incubation à 37°C pendant 2 heures, on a amené le mélange à une concentration de SDS de 0,2 % (p/v) et à une concentration d'EDTA de 20 mM et on a extrait l'ADN avec du phénol et du chloroforme et on a ajouté du tARN



de levure à la phase aqueuse finale de façon à obtenir une concentration de 5 µg/ml. On a ensuite chromatographié ce produit sur une colonne de Sephadex G150 superfine (50 x 0,7 cm) d'où on a élué les gènes bicaténaires dans la fraction
5 exclue en utilisant du NaCl 50 mM, SDS 0,1 % (p/v) et 5 µg/ml de tARN de levure. On a ensuite précipité ce dernier produit avec de l'éthanol après avoir amené les concentrations en tARN à 10 µg/ml. On a estimé que l'ADN récupéré contenait environ 0,125 µg de gènes bicaténaires.

10 (g) Fractionnement final des gènes d'interféron :

On a ensuite dissous l'ADN dans 50 µl d'H₂O et on en a soumis 20 µl à une électrophorèse à travers un gel d'agarose à 1,4 % (p/v) (20 x 14 x 0,5 cm) pendant 2 heures à 120 volts. On a ensuite élué l'ADN correspondant à une
15 longueur de 600 à 1000 bp du gel, de la manière suivante : on a excisé la tranche appropriée et on l'a fait passer à travers une aiguille 21G (Gillette). On a lavé cette dernière avec 4 ml de 10 mM de Hépes, pH 7,5, de 0,1 mM d'EDTA, de 0,02 % (v/v) de Triton X-100, de 5 µg/ml de tARN
20 de levure et on a congelé la tranche à -70°C. On l'a ensuite dégelée et on l'a agitée sur un mélangeur rotatif jusqu'au lendemain à la température ambiante (environ 25°C) avant de la filtrer à travers un papier Whatman n° 52. On a ajusté le filtrat à une concentration en acétate d'ammonium de
25 0,1 M, d'acétate de magnésium de 2 mM, de SDS de 0,02 % (p/v) et on l'a lié à une colonne de 1 ml de diéthylaminoéthyl (DEAE) 52 cellulose. On a ensuite procédé à un triple lavage avec des parties aliquotes de 1,5 ml du tampon sus-
30 mentionné avant de procéder à l'élué de l'ADN avec des fractions aliquotes de 0,5 ml de NaCl 1,1 M, d'acétate d'ammonium 0,1 M, d'acétate de magnésium 2 mM, de SDS 0,02 % (p/v) et d'EDTA 0,02 mM. On a ensuite complété l'ADN élué avec les seconde et troisième fractions aliquotes qui furent
35 alors réunies, de 5 µg de tARN de levure et on a précipité le produit à l'éthanol. On a récupéré le précipité par centrifugation, on l'a lavé à l'éthanol absolu, on l'a séché et on l'a dissous dans 20 µl d'eau. On a prélevé 4 µl pour un comptage à scintillation liquide et on a séché le résidu (environ 8 ng) par dessiccation sous vide.



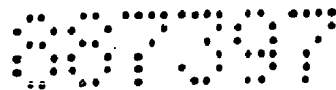
(10) Clonage des gènes d'interféron en λ 1776 en utilisant du pBR 322 comme vecteur de plasmide

On a préparé les vecteurs de la manière suivante: on a restreint 10 μ g du plasmide pBT 322 avec de l'Hind III, on l'a extrait à l'aide de phénol et de chloroforme et on l'a précipité à l'éthanol. On a ensuite incubé le plasmide linéaire récupéré à 65°C pendant 30 minutes dans 25 μ l d'un milieu contenant 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % (p/v) de SDS et 0,7 mg/ml de phosphatase alcaline bactérienne (EC 3.1.3.1), avant de procéder à une triple extraction avec du chloroforme et du phénol, à une double extraction avec de l'éther et à une nouvelle précipitation à l'éthanol. On a ensuite dissous le précipité récupéré dans 100 μ l d' H_2O .

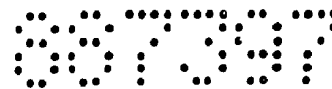
On a ensuite dissous le culot de gène séché (voir (9 - g) ci-dessus) dans 10 μ l d'un milieu contenant du Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, du $MgCl_2$ 10 mM, du rATP 1 mM, du DTT 20 mM, 10 μ g/ml d'ADN de vecteur traité et environ 16 unités/ml d'ADN ligase de T4. On a ensuite incubé ce mélange à 15°C jusqu'au lendemain avant de le diluer jusqu'à 100 μ l avec du Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, de l'EDTA 1 mM, du NaCl 0,1 M et on l'a ainsi utilisé pour transformer E. coli K-12 λ 1776 selon des procédés connus (voir, par exemple, Curtiss R., III, et coll., (1976), Recombinant Molecules: Impact on Science and Society (R.F. Beers, Jr. et E.G. Bassett (Eds.), 45-56). De cette manière, on a obtenu un total de 370 transformants résistant à l'ampicilline (100 μ g/ml) que l'on a ensuite testé quant à leur sensibilité à 10 μ g/ml de tétracycline. On a constaté que 62 % étaient sensibles à la tétracycline et on les a par conséquent identifiés comme étant des recombinants. On a ensuite fait croître 160 de ces derniers sur des filtres millipores posés par dessus des plaques de culture afin d'identifier les recombinants de gène d'interféron par hybridation de colonie avec (γ - ^{32}P) IFIA et (γ - ^{32}P) IFIV.

35 (11) Triage des recombinants

On a fait croître des recombinants sur des filtres de nitrocellulose (diamètre : 9 cm) jusqu'à ce que les colonies eussent atteint un diamètre de 2 ou 3 mm. Après avoir soulevé les filtres des plaques, on les a placés pendant



- 7 minutes sur un tampon de papiers filtres Whatman n° 1 trempés dans du NaOH 0,5 N, puis pendant 2 minutes sur un tampon trempé dans du Tris-HCl 1 M, pH 7,5, et ensuite pendant 7 minutes sur un tampon trempé dans du Tris-HCl
- 5 0,5 M, pH 7,5 et du NaCl 1,5 M. On a ensuite séché les filtres en les plaçant sur une tubulure d'aspiration de vide pendant environ 5 minutes et on les a finalement lavés avec 100 ml d'éthanol absolu avant de les chauffer pendant 2 heures à une température de 80 à 85°C. 0
- 10 On a préincubé les filtres à 25°C pendant 2 heures dans 3 x SSC (1 x SSC est constitué de NaCl 0,15 M, de citrate de sodium 0,015 M, pH 7,6) contenant du BSA (0,02 % p/v), du Ficoll (0,02 % p/v) (copolymère de saccharose et d'épichlorhydrine) et de la polyvinylpyrrolidone (0,02 %
- 15 p/v) avant d'être égouttés et placés sur un filtre de papier pour sécher à l'air pendant quelques minutes. On a marqué les oligonucléotides IFIA et IFIV radioactivement en utilisant du (γ -³²P) ATP et de polynucléotide kinase, de la manière décrite plus haut et on les a ensuite mis en sus-
- 20 pension dans 3 x SSC. On a uniformément appliqué 300 μ l (contenant 0,85 pmole de chaque (γ -³²P) oligonucléotide (environ 1 μ Ci/pmole)) sur chaque filtre (reposant alors sur une surface non absorbante) et on a laissé la substance pénétrer dans les filtres pendant environ 5 minutes. On a
- 25 submergé les filtres de paraffine légère et on les a incubés pendant 2 ou 3 jours à 25°C. On en a ensuite égoutté l'huile, on a rincé les filtres dans du chloroforme, on les a séchés à l'air et on les a lavés à quatre reprises dans 3 x SSC à 25°C (chaque lavage durant 20 minutes), avant de
- 30 les laver à deux reprises dans 2 x SSC à la même température. Après les avoir modérément séchés au buvard, on a hermétiquement enfermé les filtres dans un sac en polythène et on les a autoradiographiés à -70°C dans une cassette d'intensification Kodak regular.
- 35 L'autoradiographie a indiqué la présence de cinq colonies qui étaient manifestement plus sombres que le reste. On a préparé l'ADN de plasmide à partir de ces colonies selon des procédés connus (voir, par exemple, Birnboim H.C. et Doly J., (1979), Nucl. Acids Res., 7,
- P

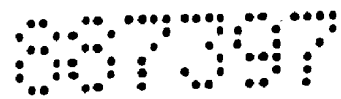


1513-1523) et la restriction subséquente et l'analyse de la séquence nucléotidique ont confirmé que chacun de ces recombinants contenait un gène d'interféron de fibroblaste codant pour le polypeptide d'interféron mûr et la séquence de mRNA non traduite en 3'.

(12) Transfert du gène d'interféron dans des plasmides d'expression pWT 2xl

On a préparé l'ADN de plasmide à partir de l'un des recombinants d'interféron susmentionnés en centrifugeant un lysat clarifié à travers des gradients de densité contenant du bromure d'éthidium (voir, par exemple, Katz L. et coll., (1973), J. Bacteriol., 114, 577-591 et Wensink P.C. et coll., (1974), Cell, 3, 315-325). On en a ensuite restreint 3 µg avec de l'Hind III et on a soumis l'ADN extrait à une électrophorèse à travers un gel de polyacrylamide (5 % p/v). On a visualisé le gène d'interféron (environ 730 bp) par coloration avec 1 µg/ml de bromure d'éthidium et en regardant sous de la lumière UV (254 nm), de façon à permettre l'excision d'une petite tranche de gel contenant le gène.

On a dispersé cette tranche en la faisant passer à travers l'orifice d'une seringue en plastique de 1 ml, cette dernière ayant été lavée avec quatre volumes, par rapport à la tranche de gel. d'AGEB (acétate d'ammonium 0,5 M, acétate de magnésium 10 mM, SDS 0,1 % (p/v) et EDTA 0,1 mM) que l'on avait mélangé à la suspension de gel en secouant modérément pendant 16 heures à 37°C. On a ajouté du tARN de levure de façon à obtenir une concentration finale de 25 µg/ml avant de concentrer le mélange à travers un papier Whatman n° 52 dans une seringue de 2 ml et de laver le papier à l'AGEB. On a ensuite dilué le filtrat total cinq fois avec de l'eau avant de procéder à une chromatographie sur une colonne de 1 ml de DEAE 52-cellulose), comme décrit plus haut (9 g). On a extrait l'éluat (1 ml au total) à deux reprises avec 1 ml d'alcool isoamylique saturé de 1/5 x AGEB contenant du NaCl 1,1 M (afin d'éliminer le bromure d'éthidium) avant de procéder à une précipitation avec de l'éthanol après l'addition de 5 µg de tARN de levure. On a récupéré l'ADN et on l'a dissous dans 50 µl d'H₂O (environ 0,2 µg d'ADN).

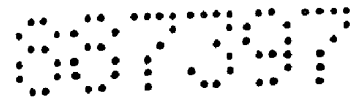


On a ensuite soudé 4 μ l du produit (dans un volume final de 10 μ l) à 80 ng de pWT 211, de pWT 221 ou de pWT 231, que l'on avait préalablement restreint à l'Hind III et ensuite traité par de la phosphatase alcaline afin de minimiser la soudure du plasmide apparenté (voir (10) ci-dessus). On a ensuite utilisé chaque soudure pour transformer E. coli K 12 HB-101 en utilisant des procédés connus (voir, par exemple, Emtage J.S. et coll., (1980), Nature, 283, 171-174).

On a fait croître des transformants sur des plaques de L-gélose contenant 100 μ g/ml d'ampicilline (en fait on a utilisé de la carbénicilline sodique (Beecham) qui est un dérivé qui peut être considéré comme lui étant équivalent; la carbénicilline est l' α -carboxybenzylpénicilline) et on a préparé l'ADN de plasmide à partir de six à douze colonies dans chaque cas. En procédant à des restrictions avec Pst I (EC 3.1.23.31) et en analysant les produits par électrophorèse en gel, on a pu identifier les recombinants tout comme l'orientation du gène d'interféron par rapport à la séquence de promoteur de tryptophane. Pour chacun des trois plasmides pWT 2x1, on a sélectionné un recombinant possédant le gène d'interféron dans l'orientation requise pour l'expression et on l'a examiné quant à son aptitude à produire un interféron biologiquement actif.

(13) Induction de plasmides d'expression contenant le gène d'interféron

On a fait croître des cultures de 150 ml de chacun des trois clones de pWT 2x1/gène d'interféron dans du bouillon L (bouillon de luria : bacto tryptone 1 % (p/v), extrait de bactolevure 0,5 % (p/v), NaCl 0,5 % (p/v), glucose 0,2 % (p/v), thymine 0,004 % (p/v) pH.7) contenant de l'ampicilline jusqu'à un O.D._{600 nm} d'environ 0,3. On a pastillé les bactéries par centrifugation, on les a lavées et on les a remises ensuite en suspension dans un milieu inducteur (42 mM de Na₂HPO₄, 22 mM de KH₂PO₄, 8,6 mM de NaCl, 18,7 mM de NH₄Cl, 0,1 mM de CaCl₂, 1,0 mM de MgSO₄, 1 μ g/ml vitamine B1, 0,2 % (p/v) de glucose, 0,5 % (p/v) de casamino acides manquant de tryptophane (Difco), 20 μ g/ml d'acide 3 β -indole acrylique et 100 μ g/ml d'ampicilline).



Après l'incubation à 37°C pendant 4 heures (moment au bout duquel le O.D._{600 nm} était d'environ 1,0), on a centrifugé les cellules et on les a extraites de la manière décrite ci-dessous.

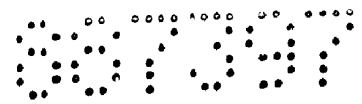
5 (14) Extraction d'interféron à partir de bactéries

On a effectué les opérations suivantes à 2°C : on a remis les culots bactériens en suspension dans 1,2 ml de PBS contenant 2 % (p/v) d'HSA (albumine de sérum humain). On a ensuite ajouté un égal volume de saccharose à 50 % (p/v) contenant du Tris-HCl 0,1 M, pH 8 et 1 % (p/v) de HSA, cette addition étant suivie de l'addition de 0,8 ml d'une solution de lysozyme fraîche (10 mg/ml dans PBS).
 10 Après 15 minutes, on a ajouté 0,8 ml d'EDTA 0,5 M de pH 8,5 et on a laissé reposer les cellules pendant 10 minutes supplémentaires. On a ensuite ajouté 4 ml de Triton X-100 à 0,6 % (v/v) et, après mélange pendant 10 minutes, on a soumis l'extrait à une sonication de façon à réduire la viscosité et à garantir une lyse complète, puis on a procédé à l'ultra-centrifugation du produit à 50.000 tpm dans un rotor Tl 50 de Beckmann, pendant 2 heures. On a dialysé la
 20 couche surnageante vis-à-vis de PBS, on l'a clarifiée par centrifugation (10.000 tpm, 10 minutes), avant de la titrer quant à son activité d'interféron en surveillant la protection conférée à des cellules Vero contre le cpe du virus EMC dans un système de titrage à microplaque in vitro
 25 (voir, par exemple, Dahl H. et Degre M., (1972), Acta. Path. Microbiol. Scan., 1380, 863).

Un autre procédé d'extraction implique la simple sonication des bactéries induites dans du Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, suivie d'une centrifugation pendant 30 minutes à 15.000 x g et le prélèvement de la couche surnageante.

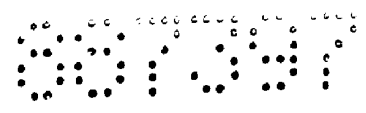
(15) Construction de recombinants d'expression modifiés

Le plasmide pWT 501 contient un fragment d'Hind III de 150 bp qui contient le promoteur de trp et la partie de la séquence de gène codant pour le polypeptide conducteur de trp. On a récupéré ce fragment à partir d'un gel de polyacrylamide (5 % - p/v) natif et on l'a autosoudé en utilisant de la T4 ADN ligase (10). Les enchaînements ont ensuite été partiellement digérés avec du Taq I avant de subir un



traitement préalable par la S1 nucléase, puis par l'ADN polymérase I d'E. coli et finalement par l'Hind III (9 f). De cette manière, la scission ou clivage au Taq I requis dans la séquence correspondant au site de liaison de ribosome dans la région du mRNA codant pour le polypeptide conducteur de trp, a engendré un fragment d'environ 100 bp suivant la restriction à l'Hind III. On a isolé ce fragment à partir d'un gel de polyacrylamide natif (8 % - p/v) (12) en préparation pour une soudure au fragment Sac I/Hind III du gène d'interféron. On a obtenu ce dernier fragment en procédant d'abord à la digestion du gène d'interféron cloné dans pWT 231 par le Sac I. Après le traitement par la S1 nucléase, puis par l'ADN polymérase I d'E. coli, on a soumis l'ADN à une restriction par l'Hind III et on a récupéré le fragment résultant d'environ 700 bp à partir d'un gel de polyacrylamide natif (5 % - p/v).

On a ensuite mutuellement soudé les deux fragments par incubation à 25°C pendant 16 heures dans un volume final de 20 µl contenant du Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, du MgCl₂ 10 mM, de l'ATP 1 mM, du DTT 20 mM, environ 480 unités/ml de T4 ADN ligase, 0,5 µg/ml du fragment d'Hind III/Taq I trp et 5 µg/ml du fragment Sac I/Hind III du gène d'interféron. Après la restriction à l'Hind III, on a transformé la molécule conjointe en K-12 HB101 d'E. coli en utilisant du pAT 153 comme vecteur. Ce dernier avait été préalablement restreint avec l'Hind III avant de subir un traitement par la phosphatase alcaline bactérienne (EC 3.1.3.1) en vue de réduire la proportion de transformants non recombinants (10). On a préparé l'ADN de plasmide à partir de transformants selon des procédés connus (voir, par exemple, Katz et coll. et Wensink et coll., loc cit) et on l'a ensuite analysé par établissement de la carte à l'enzyme de restriction et également par séquentialisation nucléotidique. De cette manière, on a identifié plusieurs recombinants contenant la molécule conjointe requise. Ces recombinants ont ensuite été induits de façon à produire de l'interféron de la manière décrite plus haut (13), à l'exception que la concentration en acide 3 β-indole acrylique avait été ajustée à 2,5 µg/ml.



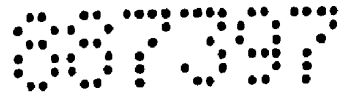
Afin de préparer l'interféron radioactif, on a induit des bactéries de la manière précédemment décrite, à l'exception que l'on a travaillé en l'absence de casamino acides et en présence de 5 µg/ml d'acide 3 3-indole acrylique. Au bout de la période d'induction, on a incubé des parties aliquotes de 1 ml pendant 15 minutes supplémentaires avec 5 µCi d'un mélange de (¹⁴C) amino acides. On a ensuite centrifugé les bactéries et on a lysé le culot par l'addition de 50 µl d'un mélange de glycérol (10 %, v/v), de 2-mercaptoéthanol (5 %, p/v), de SDS (3 %, p/v), de Tris-HCl (62,5 mM), pH 6,8, de bleu de bromophénol (0,01 % p/v) et par le chauffage à 90°C pendant 2 minutes. On a ensuite soumis les échantillons à une électrophorèse à travers des gels de polyacrylamide (12,5 %, p/v) par mise en oeuvre de procédés connus (voir, par exemple, Laemmli, U.K., (1970), Nature, 227, 680-685). On a ensuite séché le gel et on l'a autoradiographié afin de visualiser le polypeptide d'interféron (voir figure 4 des dessins annexés).

SCHEMA A (suite)

AUG AGC UAC AAC CUG (possibilités de séquence de
codage déduites)
AUG AGU UAC AAC CUG

OH 3'--TAC TCG ATG TTG GAC-5' IFIA

OH 3'--TAC TCA ATG TTG GAC-5' IFIB (amorçeurs potentiels déduits)





SCHEMA B

3' AAG.ATT.GAC.GTT.GGA.AAG.CTT.CGG.AAA.CGA.FAC.CGT.GTT.GTC.CAT.-
5' UUC.UAA.CUG.CAA.CCU.UUC.UUC.GAA.GCC.UUU.GCU.CUG.GCA.CAA.CAG.GUA.-

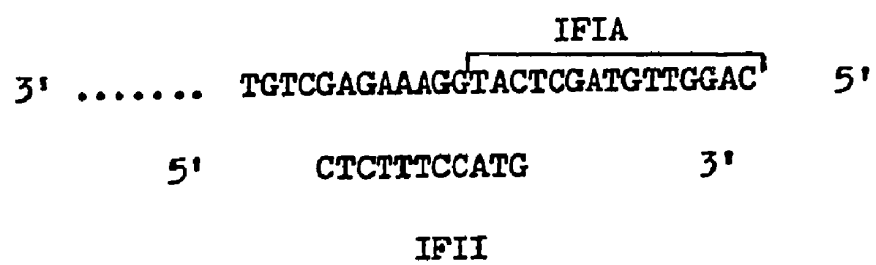
CAT.CCG.CTG.TGA.CAA.GCA.CAA.CAG.TTG.TAC.TGG.TTG.TTC.ACA.GAG.-
GUA.GGC.GAC.ACU.GUU.CGU.CGU.GUC.AAC.AUG.ACC.AAC.AAG.UGU.CUC.-

met thr asn lys cys leu

GAG.GTT.TAA.CGA.GAG.GAC.AAC.ACG.AAG.AGG.TGA.TGT.CGA.GAA.AGG.-
CUC.CAA.AUU.GCU.CUC.CUG.UUG.UGC.UUC.UCC.ACU.ACA.GCU.CUU.UCC. 3'

leu gln ile ala leu leu leu cys phe ser thr thr ala leu ser

Amorceur IFIA
TAC.TCG.ATG.TTG.GAC. 5'

SCHEMA C

SCHEMA D

IFI III

5' CAGCTCTTCCATG 3'

IFI V

5' GAGGAGATTAAG 3'

IFI V

5' CCTGGAAGAAA 3'

5' AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.-
 mARN 5' AAC.UUU.GAC.AUC.CCU.GAG.-
 protéine N asn phe asp ile pro glu.-
 40

IFIV
 GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.-
 GAG.AUU.AAG.CAG.CUG.CAG.CAG.UUC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.-
 glu ile lys gln leu gln gln phe gln lys glu asp ala ala -
 50

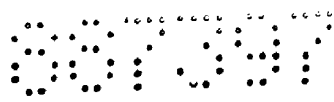
TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.-
 UUG.ACC.AUC.UAU.GAG.AUG.CUC.CAG.AAC.AUC.UUU.GCU.AUU.UUC.-
 leu thr ile tyr glu met leu gln asn ile phe ala ile phe
 10

AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.-
 AGA.CAA.GAU.UCA.UCU.AGC.ACU.GGC.UGG.AAU.GAG.ACU.AUU.GUU.-
 arg gln asp ser ser ser thr gly trp asn glu thr ile val -
 80

GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.-
 GAG.AAC.CUC.CUG.GCU.AAU.GUC.UAU.CAU.CAG.AUA.AAC.CAU.CUG.-
 glu asn leu leu ala asn val tyr his gln ile asn his leu.-
 70

IFV
 AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.-
 AAG.ACA.GUC.CUG.GAA.GAA.AAA.CUG.GAG.AAA.GAA.GAU.UUC.ACC.-
 lys thr val leu glu glu lys leu glu lys glu asp phe thr -
 100 110

AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.-
 AGG.GGA.AAA.CUC.AUG.AGC.AGU.CUG.CAC.CUG.AAA.AGA.UAU.UAU.-
 arg gly lys leu met ser ser leu his leu lys arg tyr tyr
 120



GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.-

GGG.AGG.AUU.CUG.CAU.UAC.CUG.AAG.GCC.AAG.GAG.UAC.AGU.CAC.-

gly arg ile ¹³⁰ leu his tyr leu lys ala lys glu tyr ser ¹⁴⁰ his -

TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.CTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.-

UGU.GCC.UGG.ACC.AUA.GUC.AGA.GUG.GAA.AUC.CUA.AGG.AAC.UUU.-

cys ala trp thr ile val arg val glu ¹⁵⁰ ile leu arg asn phe -

TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.CGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.-

UAC.UUC.AUU.AAC.AGA.CUU.ACA.GGU.UAC.CUC.CGA.AAC.UGA.AGA.UCU.-

tyr phe ile asn arg ¹⁶⁰ leu thr gly tyr leu arg ¹⁶⁶ asn -

SCHEMA F

Brin codeur : 5' TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.TTC.GAA.-

Brin complémentaire : 3' AAG.ATT.GAC.GTT.GGA.AAG.CTT.-

GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.CAC.-

CGG.AAA.CGA.GAC.CGT.GTT.GTC.CAT.CAT.CCG.CTG.-

ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.-

TGA.CAA.GCA.CAA.CAG.TTG.TAC.TGG.TTG.TTC.ACA.-

CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.-

GAG.GAG.GTT.TAA.CGA.GAG.GAC.AAC.ACG.AAG.AGG.TGA.-

ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.-

TGT.CGA.GAA.AGG.TAC.TCG.ATG.TTG.ACC.GAA.CCT.AAG.-

CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.-

GAT.GTT.TCT.TCG.TCG.TTA.AAA.GTC.ACA.GTC.TTC.GAG.GAC.ACC.-

CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.AAG.GAC.-

GTT.AAC.TTA.CCC.TCC.GAA.CTT.ATG.ACG.GAG.TTC.CTG.-

AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.-

TCC.TAC.TTG.AAA.CTG.TAG.GGA.CTC.CTC.TAA.TTC.GTC.-

CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.-

GAC.GTC.GTC.AAG.GTC.TTC.CTC.CTG.CGG.CGT.AAC.-



ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.-
TGG.TAG.ATA.CTC.TAC.GAG.GTC.TTG.TAG.AAA.CGA.TAA.AAG.TCT.-

CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.CGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.-
GTT.CTA.AGT.AGA.TCG.TGA.CCG.ACC.TTA.CTC.TGA.TAA.CAA.CTC.-

AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.-
TTG.GAG.GAC.CGA.TTA.CAG.ATA.GTA.GTC.TAT.TTG.GTA.GAC.TTC.-

ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.-
TGT.CAG.GAC.CTT.CTT.TTT.GAC.CTC.TTT.CTT.CTA.AAG.TGG.TCC.-

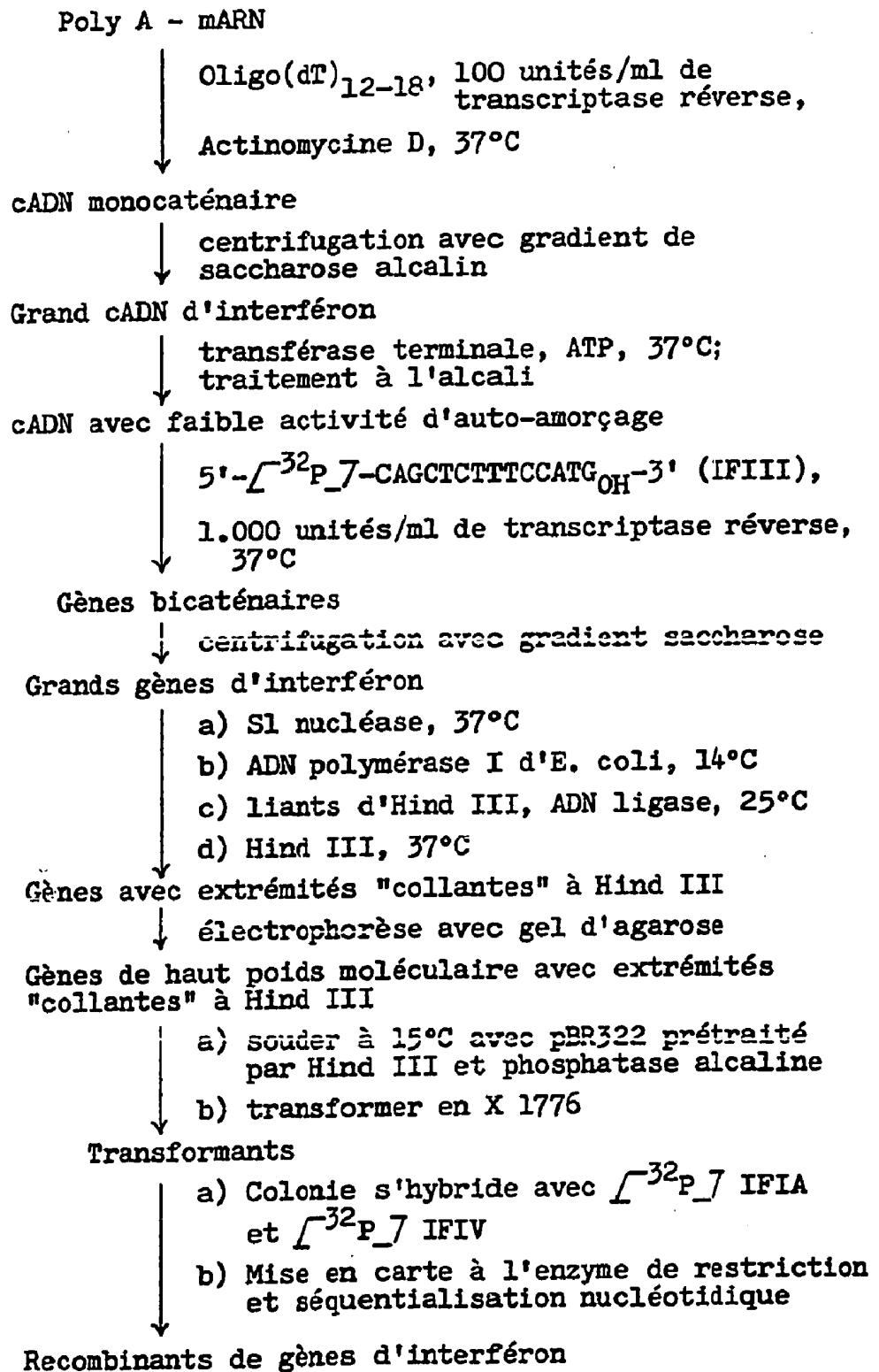
GGA.AAA.CTC.ATC.ACC.AGT.CTG.CAG.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
CCT.TTT.GAG.TAC.TCG.TCA.GAC.GTG.GAC.TTT.TCT.ATA.ATA.CCC.TCC.-

ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.-
TAA.GAC.GTA.ATG.GAC.TTC.CGG.TTC.CTC.ATG.TCA.GTG.ACA.CGG.ACC.-

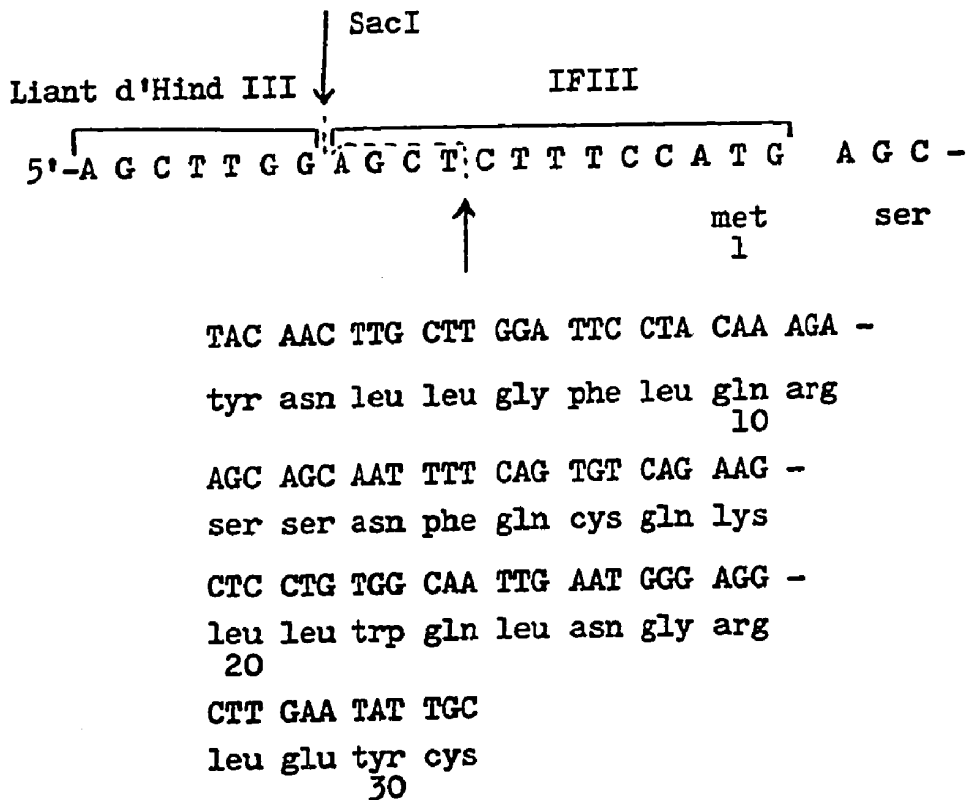
ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.-
TGG.TAT.CAG.TCT.CAC.CTT.TAG.GAT.TCC.TTG.AAA.ATG.AAG.TAA.TTG.-

AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT....

TCT.GAA.TGT.CCA.ATG.GAG.GCT.TTG.ACT.TCT.AGA....

SCHEMA G

SCHEMA H



P

SCHEMA J

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.AAG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-
TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.-
CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.-
GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.-
TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.-
AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.-
CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.AAC.CA...3'

✓

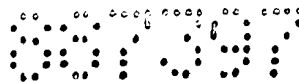
RE V E N D I C A T I O N S

1. Gène pour l'expression d'une protéine possédant des propriétés ressemblant à celles de l'interféron humain, caractérisé en ce qu'il est constitué par un
 5 brin codeur et un brin complémentaire, le brin codeur comprenant la séquence suivante :

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
 TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
 GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
 10 GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-
 TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
 TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
 TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
 AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
 15 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
 GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
 CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
 GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
 AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
 20 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
 TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
 ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
 AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.-
 CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.-
 25 GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.-
 TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.-
 AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CA 3'

ou une sous-unité de celui-ci ou un équivalent de celui-ci.

P

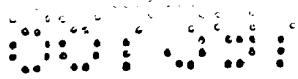


2. Gène suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le brin codeur comprend la séquence suivante :

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
 TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
 5 GTT.CGT.GTT.GTC AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
 GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-
 TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
 TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
 TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
 10 AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
 GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
 CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
 GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
 15 AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
 TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
 ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.SGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
 AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.-
 20 CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.-
 GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.-
 TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.-
 AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.-
 CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.AAC.CA..3' ou une sous-unité de
 25 celui-ci ou un équivalent de celui-ci.

3. Gène suivant l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le brin codeur comprend la séquence qui suit :

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.-



CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.-
 GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.-
 CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.-
 CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.-
 5 AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.-
 AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAT.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.-
 TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.-
 CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.-
 CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.-
 10 ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.-
 AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.-
 GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.-
 CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.-
 15 GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.-
 TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.-
 AGA.TCT.CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.-
 TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.-
 GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.-
 20 TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.-
 TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.-
 AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.-
 AAC.CA..3' ou une sous-unité de celui-ci.

25 4. Gène suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le brin codeur comprend la séquence suivante :

5' TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.-
 CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.-

ACC. AAC. AAG. TGT. CTC. CTC. CAA. ATT. GCT. CTC. CTG. TTG. TGC. -
 TTC. TCC. ACT. ACA. GCT. CTT. TCC. ATG. AGC. TAC. AAC. TTG. CTT. -
 GGA. TTC. CTA. CAA. AGA. AGC. AGC. AAT. TTT. CAG. TGT. CAG. AAG. -
 CTC. CTG. TGG. CAA. TTG. AAT. GGG. AGG. CTT. GAA. TAC. TGC. CTC. -
 5 AAG. GAC. AGG. ATG. AAC. TTT. GAC. ATC. CCT. GAG. GAG. ATT. AAG. -
 CAG. CTG. CAG. CAG. TTC. CAG. AAG. GAG. GAC. GCC. GCA. TTG. ACC. -
 ATC. TAT. GAG. ATG. CTC. CAG. AAC. ATC. TTT. GCT. ATT. TTC. AGA. -
 CAA. GAT. TCA. TCT. AGC. ACT. GGC. TGG. AAT. GAG. ACT. ATT. GTT. -
 GAG. AAC. CTC. CTG. GCT. AAT. GTC. TAT. CAT. CAG. ATA. AAC. CAT. -
 10 CTG. AAG. ACA. GTC. CTG. GAA. GAA. AAA. CTG. GAG. AAA. GAA. GAT. -
 TTC. ACC. AGG. GGA. AAA. CTC. ATG. AGC. AGT. CTG. CAC. CTG. AAA. -
 AGA. TAT. TAT. GGG. AGG. ATT. CTG. CAT. TAC. CTG. AAG. GCC. AAG. -
 GAG. TAC. AGT. CAC. TGT. GCC. TGG. ACC. ATA. GTC. AGA. GTG. GAA. -
 ATC. CTA. AGG. AAC. TTT. TAC. TTC. ATT. AAC. AGA. CTT. ACA. GGT. -
 15 TAC. CTC. CGA. AAC. TGA. AGA. TCT. CCT. AGC. CTG. TGC. CTC. TGG. -
 GAC. TGG. ACA. ATT. GCT. TCA. AGC. ATT. CTT. CAA. CCA. GCA. GAT. -
 GCT. GTT. TAA. GTG. ACT. GAT. GGC. TAA. TGT. ACT. GCA. TAT. GAA. -
 AGG. ACA. CTA. GAA. GAT. TTT. GAA. ATT. TTT. ATT. AAA. TTA. TGA. -
 GTT. ATT. TTT. ATT. TAT. TTA. AAT. TTT. ATT. TTG. GAA. AAT. AAA. -
 20 TTA. TTT. TTG. GTG. CAA. AAG. TC..3' ou un équivalent de celui-ci.

5. Gène suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le brin codeur comprend la séquence qui suit :

5' ATG. ACC. AAC. AAG. TGT. CTC. CTC. CAA. ATT. GCT. CTC. CTG. TTG. -
 25 TGC. TTC. TCC. ACT. ACA. GCT. CTT. TCC. ATG. AGC. TAC. AAC. TTG. -
 CTT. GGA. TTC. CTA. CAA. AGA. AGC. AGC. AAT. TTT. CAG. TGT. CAG. -
 AAG. CTC. CTG. TGG. CAA. TTG. AAT. GGG. AGG. CTT. GAA. TAC. TGC. -
 CTC. AAG. GAC. AGG. ATG. AAC. TTT. GAC. ATC. CCT. GAG. GAG. ATT. -

AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.-
 ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.-
 AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.-
 GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.-
 5 CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.-
 GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.-
 AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.-
 AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.-
 GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.-
 10 GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.. 3' ou un équivalent de celui-ci.

6. Gène suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le brin codeur comprend la séquence qui suit :

5' ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.-
 15 AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.-
 GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.-
 GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.-
 AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.-
 AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.-
 20 GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.-
 GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC. CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.-
 GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.-
 ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.-
 CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
 25 TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.-
 TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA. 3'
 ou un équivalent de celui-ci.

φ

7. Sous-unité d'un gène suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6.

5 8. Gène ou un équivalent de celui-ci ou une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7, en substance, tel que décrit plus haut.

10 9. Procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 4 à 8, caractérisé en ce que l'on isole le polyA-mARN de cellules de fibroblastes induites, on synthétise le cADN monocaténaire en utilisant l'oligo dT amorceur et la transcriptase reverse et on en synthétise l'ADN bicaténaire en utilisant la transcriptase reverse ou l'ADN polymérase I d'E. coli et éventuellement un amorceur.

15

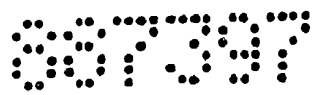
20 10. Procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 4 à 8, caractérisé en ce que l'on isole le mARN de cellules de fibroblastes induites, on synthétise le cADN en utilisant un amorceur spécifique et la transcriptase reverse et on en synthétise l'ADN bicaténaire en utilisant la transcriptase reverse ou l'ADN polymérase I d'E. coli et éventuellement un amorceur.

25 11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que l'on utilise un amorceur au cours de la troisième étape.

30 12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que l'on fractionne le mélange réactionnel après la seconde étape et/ou la troisième étape.

35 13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé en ce qu'on inhibe l'autoamorçage après la seconde étape.

14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 9 à 13, caractérisé en ce que l'on identifie le produit, après clonage, en utilisant un amor-



ceur pour trier les colonies.

5 15. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 9 à 14 pour la production d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci, suivant l'une quelconque des revendications 4 à 8, en substance, tel que décrit plus haut.

10 16. Gène ou un équivalent de celui-ci ou une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 4 à 8, lorsqu'il est obtenu par mise en oeuvre d'un procédé suivant l'une quelconque des revendications 9 à 15.

15 17. Procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on utilise, à titre de sonde, une molécule possédant une séquence d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 16, de façon à isoler un gène d'interféron chromosomal à partir de l'ADN chromosomal humain.

20 18. Procédé suivant la revendication 17 pour la production d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, en substance, tel que décrit plus haut.

25 19. Gène ou un équivalent de celui-ci ou une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, lorsqu'il est obtenu par mise en oeuvre d'un procédé suivant l'une quelconque des revendications 17 et 18.

30 20. Procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci, qui possède une portion commune à ou apparentée à une portion d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on utilise, à titre de sonde, une molécule possédant une

7

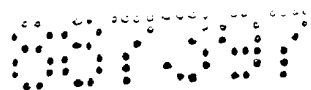
séquence correspondant à au moins une partie de la portion commune ou apparentée de façon à isoler un gène chromosomal humain à partir de l'ADN chromosomal humain.

5 21. Procédé de production d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci, qui possède une portion commune à ou apparentée à une portion d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des
10 revendications 1 à 3, en substance, tel que décrit plus haut.

15 22. Gène ou un équivalent de celui-ci ou une sous-unité de celui-ci qui possède une portion commune à ou apparentée à une portion d'un gène ou d'un équivalent de celui-ci ou d'une sous-unité de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, lorsqu'il est produit par un procédé suivant l'une quelconque des revendications 20 et 21.

20 23. Recombinant de plasmide, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur de plasmide auquel est inséré, à un site d'insertion, un gène ou une sous-unité de celui-ci ou un équivalent de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, 16 et 19, le recombinant de plasmide permettant la traduction dans la phase
25 correcte pour le mARN correspondant au gène ou à la sous-unité de celui-ci ou à l'équivalent de celui-ci, inséré et possédant un promoteur bactérien en amont du et adjacent au site d'insertion, de telle manière que le gène inséré ou la sous-unité de celui-ci ou l'équivalent de celui-ci soit sous le contrôle d'un promoteur
30 bactérien.

35 24. Recombinant de plasmide suivant la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend, à l'état inséré, une multiplicité de gènes ou de sous-unités de celui-ci ou d'équivalents de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, 16 et 19.



25. Recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 et 24, caractérisé en ce qu'il comprend une multiplicité de promoteurs bactériens.

5 26. Recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 25, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un promoteur de trp.

10 27. Recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 26, qui est dépourvu d'au moins une partie de la séquence d'ADN responsable de l'atténuation de la transcription.

28. Recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 27, caractérisé en ce qu'il comprend un dérivé modifié de pWT 501.

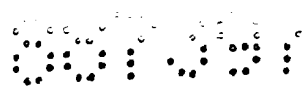
15 29. Recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur de plasmide possédant, à l'état inséré, un gène ou une sous-unité de celui-ci ou d'un équivalent de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, 16 et 19, qui code également pour un codon d'initiation et/ou au moins une partie d'un site de liaison de ribosome.

25 30. Recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 29, en substance, tel que décrit plus haut.

30 31. Procédé de production d'un recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 30, caractérisé en ce que l'on insère un gène ou une sous-unité de celui-ci ou un équivalent de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, 16 et 19, dans un site d'insertion d'un vecteur de plasmide approprié.

35 32. Procédé suivant la revendication 31, caractérisé en ce qu'il comprend : l'isolement d'un fragment d'Hind III d'environ 150 bp contenant du promoteur de trp à partir de pWT 501, l'autosoudure ou

7



autoliaison, la digestion partielle par le Taq I, le traitement par la S1 nucléase, le traitement par l'ADN polymérase I d'E. coli, la restriction par l'Hind III, l'isolement d'un fragment d'environ 100 bp contenant du promoteur de trp, la soudure ou liaison à un fragment d'environ 700 bp obtenu en traitant un plasmide de recombinant de pWT 321 contenant un gène ou une sous-unité de celui-ci ou un équivalent de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, 16 et 19, par du Sac I, la S1 nucléase, l'ADN polymérase I d'E. coli et l'Hind III, la restriction par l'Hind III et la soudure ou liaison au pAT 153 traité par la phosphatase alcaline bactérienne, restreint à l'Hind III.

33. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 et 32, en substance, tel que décrit plus haut.

34. Recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 30, obtenu par mise en oeuvre du procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 33.

35. Cellule, caractérisée en ce qu'elle comprend, à l'état inséré, un gène ou une sous-unité de celui-ci ou un équivalent de celui-ci suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, 16 et 19, ou un recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 30 et 34.

36. Cellule suivant la revendication 35, caractérisée en ce qu'elle est une cellule K-12 HB101 d'E. coli.

37. Cellule suivant l'une quelconque des revendications 35 et 36, en substance, telle que décrite plus haut.

38. Procédé de production d'une cellule suivant l'une quelconque des revendications 35 à 37, caractérisé en ce que l'on insère un gène ou une sous-unité de celui-ci ou un équivalent de celui-ci, suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, 16 et 19 ou



un recombinant de plasmide suivant l'une quelconque des revendications 23 à 30 et 34 dans une cellule.

39. Procédé suivant la revendication 38, en substance, tel que décrit plus haut.

5 40. Cellule suivant l'une quelconque des revendications 35 à 37, produite par mise en oeuvre du procédé suivant l'une quelconque des revendications 38 et 39.

10 41. Procédé de production d'une protéine possédant des propriétés ressemblant à celles de l'interféron humain, caractérisé en ce que l'on cultive une cellule suivant l'une quelconque des revendications 35 à 37 et 40 et on récupère la protéine exprimée.

15 42. Procédé suivant la revendication 41, en substance, tel que décrit plus haut.

43. Protéine possédant des propriétés qui ressemblent à celles de l'interféron humain, lorsqu'elle est produite par mise en oeuvre du procédé suivant l'une quelconque des revendications 41 et 42.

BRUXELLES, le 5 FEV. 1981

P. Par

J.D. Searle & Co.

P. Par BUREAU VANDER HAEGHEM

J. J. J.

G.D. Searle & Co.

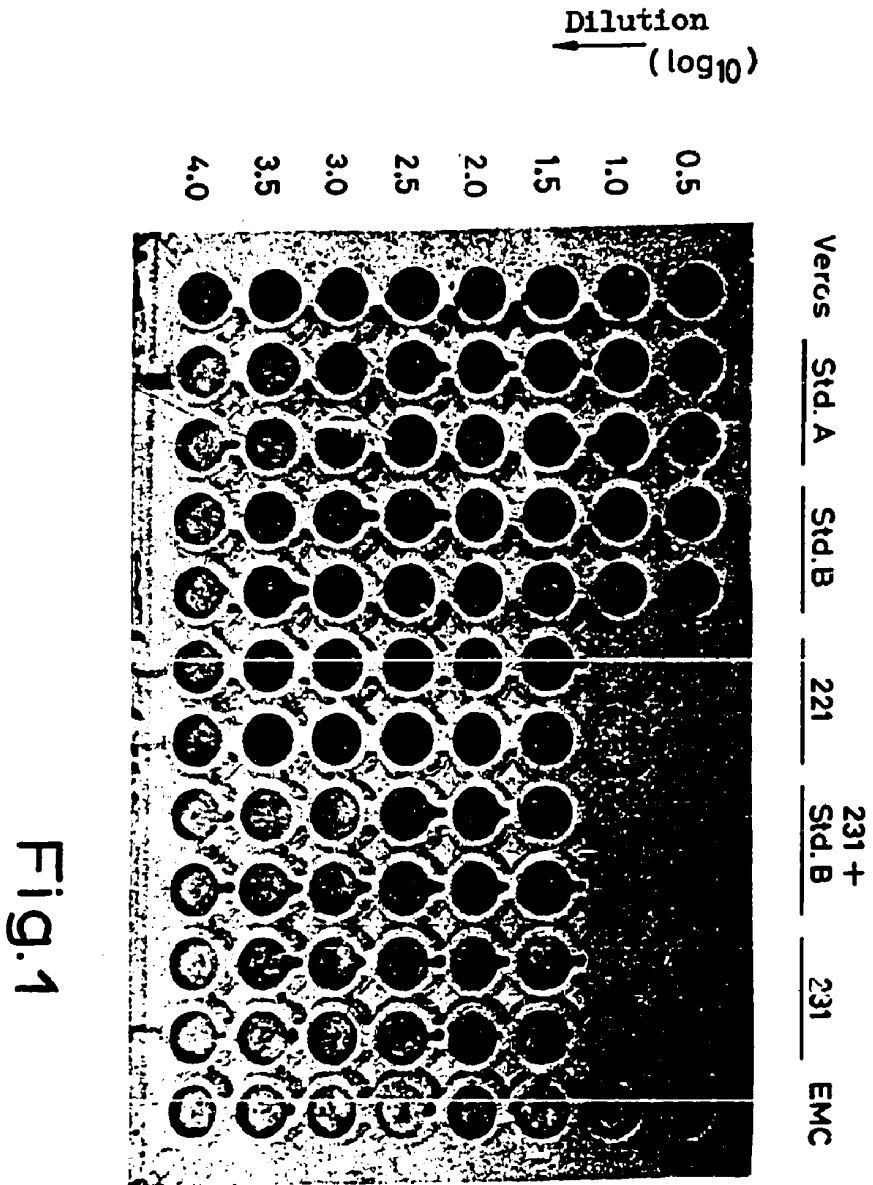


Fig. 1

BRUXELLES, le 5. 2. 1957

P. Per G.D. Searle & Co.

R. Pons BIIRFAU SAISON MARCHÉ

G. J. Plet

G.D. Leake & Co. 307

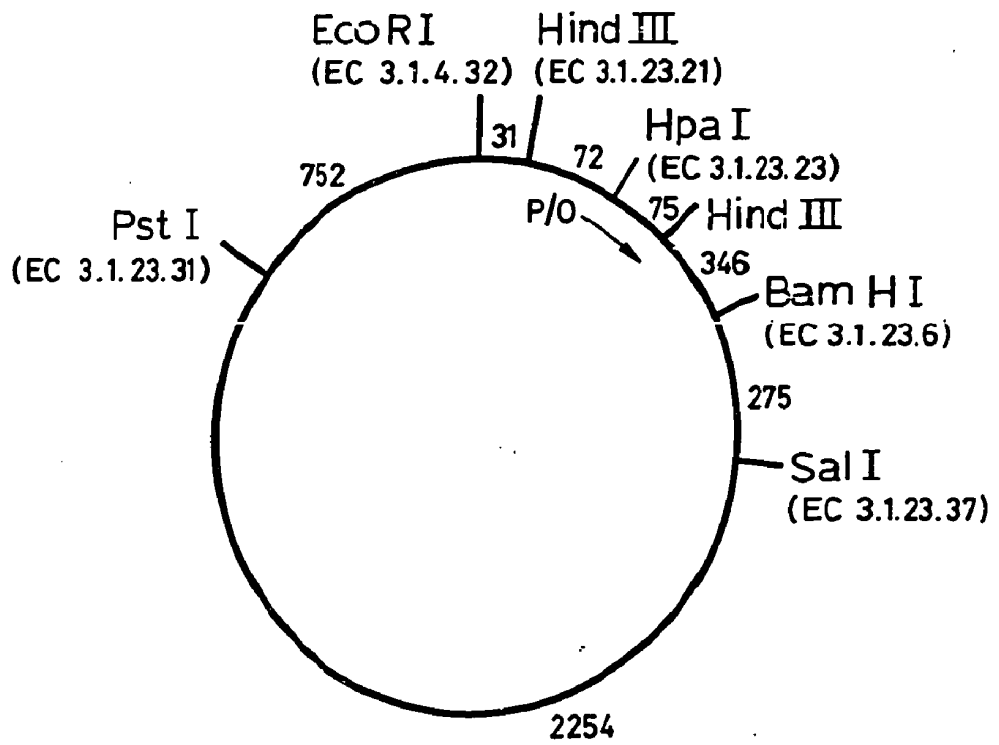


Fig.2

BRUXELLES, le 5.2.1987

P. Pour

G.D. Leake & Co.

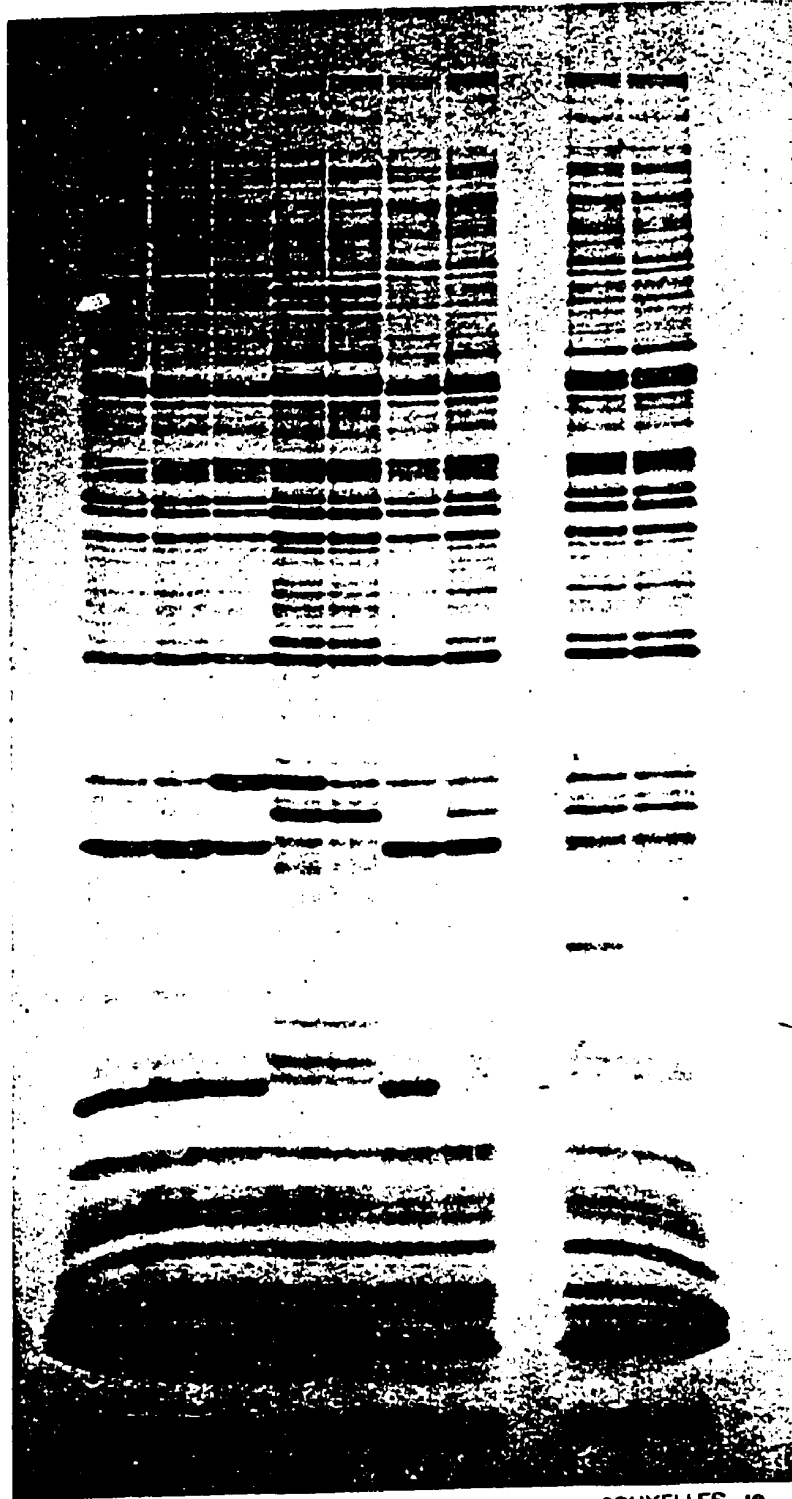
Par BURFAU SANDER HAEGHE

[Signature]

G.D. Seale & Co.

a b c d

f g



◀ 24 KD

(Calibres des
interférons)

◀ 19 KD

Fig. 3

BRUXELLES, le

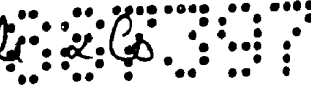
5 2 1982

P. par

G.D. Seale & Co.

Par RIRFANS ARDER HAEGHEV

(Signature)

G. J. Leal 

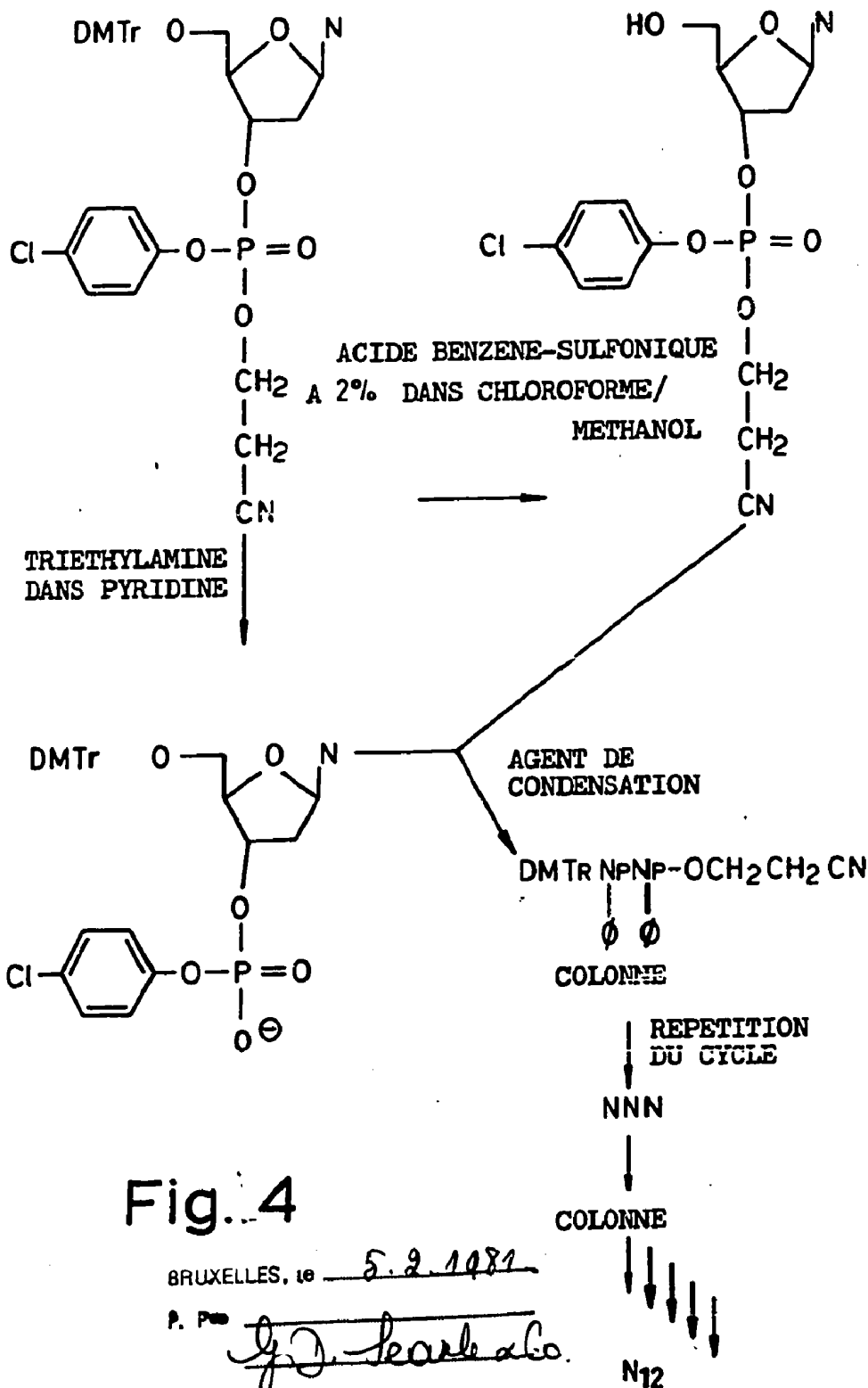
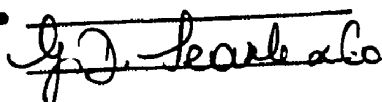


Fig. 4

BRUXELLES, le 5.2.1981

P. Par 

P. Par BUREAU VANDER HAEGHEV

