

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 706 485**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **93 07164**

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 N 15/11 , 1/19 , 15/81 , C 12 P 21/02

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15.06.93.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 23.12.94 Bulletin 94/51.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE-POULENC RORER (S.A.) —
FR.

⑦2 Inventeur(s) : Bolotin Monique et Menart Sandrine.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Rhône-Poulenc Rorer S.A. Direction
Brevets.

⑤4 Promoteur de levure et son utilisation.

⑤7 La présente invention concerne des séquences d'ADN possédant une activité de promoteur transcriptionnel et les vecteurs d'expression contenant ces séquences. Elle concerne également l'utilisation de ces séquences pour l'expression de gènes recombinés.

FR 2 706 485 - A1



PROMOTEUR DE LEVURE ET SON UTILISATION

La présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire. Plus particulièrement, elle concerne une nouvelle séquence d'ADN présentant une activité de promoteur transcriptionnel, des vecteurs d'expression contenant cette séquence, et son utilisation pour la production de protéines recombinantes, et par exemple de protéines hétérologues. L'invention concerne aussi les cellules recombinées contenant cette séquence d'ADN.

Les progrès accomplis dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de modifier des microorganismes pour leur faire produire des protéines hétérologues. En particulier, de nombreuses études génétiques ont porté sur la bactérie *E.coli*. Toutefois, l'application industrielle de ces nouveaux modes de production est encore limitée, en particulier par les problèmes d'efficacité d'expression des gènes dans ces microorganismes recombinés. Aussi, dans le but d'augmenter les performances de ces systèmes de production, des recherches ont été effectuées afin d'isoler des promoteurs forts, permettant d'obtenir des niveaux élevés d'expression de protéines hétérologues. Chez *E.coli*, on peut citer en particulier les promoteurs des opérons tryptophane et lactose.

Plus récemment, chez la levure *S.cerevisiae*, des études ont porté sur des promoteurs dérivés de gènes impliqués dans la glycolyse. On peut citer notamment les travaux sur le promoteur du gène de la 3-phosphoglycérate kinase PGK (Dobson et al., Nucleic Acid Res. 10, 1982, 2625; Hitzeman et al., Nucleic Acid Research 1982, 7791), sur celui du gène de la glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase GAPDH (Holland et al., J.Biol.Chem. 254, 1979, 9839; Musti et al., Gene 25, 1983, 133), sur celui du gène de l'alcool deshydrogénase 1 ADH1 (Bennentzen et al., J.Biol.Chem. 257, 1982, 3018; Denis et al., J.Biol.Chem. 25, 1983, 1165), sur celui du gène de l'enolase 1 ENO1 (Uemura et al., Gene 45, 1986, 65), sur celui du gène GAL1/GAL10 (Johnston et Davis, Mol. Cell. Biol. 4 (1984) 1440) ou sur celui du gène CYC1 (Guarente et Ptashne, PNAS 78 (1981) 2199).

Récemment, des outils génétiques ont été développés afin de se servir de la levure *Kluyveromyces* comme cellule hôte pour la production de protéines recombinantes. La mise en évidence d'un plasmide de type 2-micron originaire de *K. drosophilum* (plasmide pKD1 - EP 241 435) a permis d'établir un système hôte/vecteur très efficace pour la production de protéines recombinantes (EP 361 991). Cependant, les promoteurs utilisés dans ce système n'ont pas été optimisés

jusqu'à présent. En particulier, il s'agit essentiellement de promoteurs hétérologues, c'est-à-dire provenant d'autres microorganismes, tel que notamment *S.cerevisiae*. Cette situation peut engendrer différents inconvénients, et notamment limiter l'activité du promoteur à cause de l'absence de certains éléments de la machinerie transcriptionnelle (par exemple de trans-activateurs), présenter une certaine toxicité pour la cellule hôte due à une absence de régulation, ou affecter la stabilité du vecteur.

Dans ces conditions, le manque de promoteurs homologues forts chez *Kluyveromyces* constitue un facteur limitant dans l'exploitation industrielle de ce système d'expression.

La Demanderesse a maintenant identifié, cloné et séquencé une région du génome de *Kluyveromyces lactis* présentant une activité de promoteur transcriptionnel (voir SEQ ID n° 1). Plus précisément, cette région correspond au promoteur du gène d'une protéine impliquée dans le transport de sucres. Cette région, ou des dérivés ou fragments de celle-ci, peut être utilisée de manière très performante pour la production de protéines recombinantes chez les levures du genre *Kluyveromyces*. Il est entendu que cette séquence peut également être utilisée dans d'autres organismes hôtes.

De plus, un avantage de l'activité promotrice obtenue réside dans son caractère régulable. De ce fait, selon les conditions d'utilisation (milieu, souche), il est possible de contrôler l'activité du promoteur, et donc de déclencher ou de réprimer l'expression d'un gène recombiné.

Un objet de la présente invention réside donc dans une séquence d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire, ou d'un dérivé de celles-ci, et possédant une activité de promoteur transcriptionnel.

Au sens de la présente invention, on entend par dérivé, toute séquence obtenue à partir de la séquence SEQ ID n° 1 par modification(s) de nature génétique et/ou chimique, conservant une activité de promoteur. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on entend toute mutation, délétion, substitution, addition, et/ou modification d'un ou plusieurs nucléotides. De telles modifications peuvent être effectuées dans différents buts, et notamment celui de préparer des promoteurs portables, ou celui de préparer des promoteurs adaptés à l'expression dans un type particulier de vecteur ou d'hôte, celui de réduire la taille, d'augmenter l'activité de promoteur de la transcription, de générer des promoteurs inductibles, d'améliorer le

niveau de régulation, ou encore de changer la nature de la régulation. De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagénèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle.

5 Lorsqu'un dérivé tel que défini ci-dessus est réalisé, son activité de promoteur transcriptionnel peut être mise en évidence de plusieurs façons, et en particulier en plaçant sous le contrôle de la séquence étudiée, un gène reporteur dont l'expression est détectable. Toute autre technique connue de l'homme de l'art peut bien évidemment être utilisée à cet effet.

10 La séquence SEQ ID n° 1 a été obtenue à partir d'une banque de fusion entre des fragments du génome de *K.lactis* 2359/152 et le gène *lacZ* de *E.coli* selon le protocole décrit dans les exemples. Il est entendu que l'homme du métier peut isoler cette région par hybridation au moyen d'une sonde comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n°1 ou de son brin complémentaire. Les dérivés selon l'invention
15 peuvent ensuite être préparés à partir de cette séquence, comme indiqué dans les exemples.

 L'invention concerne également un fragment d'ADN comprenant tout ou partie du fragment BglIII-BamHI de 3 kb décrit sur la figure 3 et possédant une activité de promoteur transcriptionnel.

20 Un autre objet de l'invention concerne un ADN recombinant comprenant une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus.

 Cet ADN recombinant peut contenir par exemple la séquence promotrice SEQ ID n° 1 ou un dérivé de celle-ci, dans laquelle est inséré un site de restriction, facilitant l'utilisation de cette séquence comme promoteur "portable".

25 Préférentiellement, cet ADN recombinant contient en outre un ou plusieurs gènes de structure. En particulier, il peut s'agir de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. A titre d'exemple, on peut citer les enzymes (tels que notamment la superoxide dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine, etc), les dérivés sanguins (tels que la sérum-
30 albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur de von Willebrand, la fibronectine, l'alpha-1 antitrypsine, etc), l'insuline et ses variants, les lymphokines (telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies [G-CSF, GM-CSF, M-CSF...], le TNF, le TRF, etc), les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, le FGF, l'EGF, le
35 PDGF, le TGF, etc), les apolipoprotéines, des polypeptides antigéniques pour la

réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Eppstein-Barr, herpes, etc), ou encore des fusions de polypeptides telles que notamment des fusions comportant une partie active fusionnée à une partie stabilisatrice (par exemple des fusions entre l'albumine ou des fragments d'albumine et le récepteur ou une partie d'un récepteur de virus [CD4, etc.]).

Encore plus préférentiellement, l'ADN recombinant contient également des signaux permettant la sécrétion du produit d'expression du ou desdits gènes de structure. Ces signaux peuvent correspondre aux signaux naturels de sécrétion de la protéine considérée, mais ils peuvent être d'une origine différente. En particulier des signaux de sécrétion dérivés de gènes de levure peuvent être utilisés, tels que ceux des gènes de la toxine killer (Stark et Boyd, EMBO J. 5 (1986) 1995) ou de la phéromone alpha (Kurjan et Herskowitz, Cell 30 (1982) 933; Brake et al., Yeast 4 (1988) S436).

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'ADN recombinant fait partie d'un plasmide d'expression, qui peut être à réplication autonome ou intégratif.

En particulier, des vecteurs à réplication autonome peuvent être obtenus en utilisant des séquences à réplication autonomes chez l'hôte choisi. Notamment, chez la levure, il peut s'agir d'origines de réplication dérivées de plasmides (pKD1, 2 μ , etc), ou bien de séquences chromosomiques (ARS).

Les vecteurs intégratifs peuvent être obtenus notamment en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées contenant une séquence d'ADN telle que définie ci-avant.

Avantageusement, les cellules sont choisies parmi les levures, et encore plus préférentiellement, parmi les levures du genre *Kluyveromyces*. Il est entendu cependant que l'invention couvre toutes les cellules recombinées dans lesquelles les régions promotrices de l'invention sont actives, qu'il s'agisse de cellules eucaryotes ou procaryotes. Ainsi, parmi les cellules eucaryotes, on peut citer les cellules végétales, animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc. Parmi les champignons susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp.

Comme hôtes procaryotes, on peut utiliser les bactéries telles que *Escherichia coli*, ou celles appartenant aux genres *Corynebacterium*, *Bacillus* ou *Streptomyces*.

L'activité de promoteur de la transcription des séquences de l'invention dans ces différents hôtes peut être vérifiée par exemple en introduisant dans la cellule hôte
5 considérée un ADN recombinant comprenant, sous le contrôle de la séquence promotrice étudiée, un gène reporteur dont l'expression peut être mise en évidence dans l'hôte considéré.

Les cellules recombinées de l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule. Il peut s'agir
10 notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. S'agissant de la transformation, différents protocoles ont été décrits dans l'art antérieur. En particulier, elle peut être réalisée en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol selon la technique décrite par Ito et al. (*J. Bacteriol.* 153 (1983)
15 163-168), ou en présence d'éthylène glycol et de diméthylsulfoxyde selon la technique de Durrens et al. (*Curr. Genet.* 18 (1990) 7). Un protocole alternatif a également été décrit dans la demande de brevet EP 361 991. S'agissant d'électroporation, elle peut être réalisée selon Becker et Guarentte (in : *Methods in Enzymology Vol194* (1991) 182).

20 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une séquence telle que précédemment définie pour l'expression de gènes recombinés. Les séquences d'ADN selon l'invention peuvent en effet permettre une production à des niveaux élevés de protéines recombinantes.

Avantageusement, les séquences de l'invention peuvent être utilisées pour
25 l'expression de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. A titre d'exemple, on peut citer les protéines énumérées précédemment.

La présente invention permet également la réalisation d'un procédé de production de protéines recombinantes, selon lequel on cultive une cellule
30 recombinée telle que définie ci-avant et on récupère la protéine produite. A titre d'exemple de protéine, on peut citer les protéines énumérées précédemment.

Par ailleurs, un aspect particulièrement avantageux de l'invention réside dans la possibilité de réguler l'activité des promoteurs. La demanderesse a en effet montré que le promoteur de la séquence SEQ ID n° 1 était réprimé par le glucose et actif en
35 présence de lactose. Ainsi, dans la souche SD6 (Cf exemple I/B.1.), le promoteur de

la séquence SEQ ID n° 1 est 50 à 100 fois plus actifs en présence de lactose qu'en présence de glucose. Ce résultat est intéressant car il permet de réaliser un procédé de production de protéines recombinantes dans lequel les phases de croissance des cellules et d'expression du gène recombiné désiré sont séparées. Ainsi, en milieu
5 glucose, les cellules recombinantes se divisent jusqu'à une phase stationnaire. A cet instant, la concentration en glucose du milieu de culture a fortement baissé, ce qui permet de déréguler l'expression du gène d'intérêt.

Préférentiellement, le procédé de l'invention est applicable à la production de sérum-albumine humaine, ou un de ses variants moléculaires. On entend par
10 variant moléculaire de l'albumine, les variants naturels résultant du polymorphisme de l'albumine, les formes tronquées, ou toute protéine hybride à base d'albumine.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

- 15 SEQ ID n° 1 : Séquence nucléotidique du fragment de 1 kb correspondant au promoteur d'un gène transporteur de sucre de *K. lactis*.
- Figure 1 : Préparation du transposon Mini Mu MudIIK1.
- Figure 2 : Carte de restriction du transposon Mini Mu MudIIK1.
- Figure 3 : Carte de restriction du clone 2C5.
- 20 Figure 4 : Carte de restriction du fragment BglII-BamHI de 3 kb portant la séquence SEQ ID n° 1.

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en
25 gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli* etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature
30 [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), ou Pharmacia et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

5 Les plasmides de type pBR322 et pUC sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de
10 l'ADN ligase du phage T4 (Boehringer) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Boehringer) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes peut être effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les
15 recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes peut être effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764].

20 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cyler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

25 La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467].

Les transformations de *K. lactis* sont effectuées par toute technique connue de l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

30 Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont *E.coli* DH1 (Hanahan D., J. Mol. Biol. 166 (1983) 557) ou *E.coli* JM109::(Mucls) (Daignan-fornier et Bolotin-Fukuhara, Gene 62 (1988) 45).

Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre *Kluyveromyces*. Les souche *K. lactis*
35 2359/152 et *K. lactis* SD6 ont été particulièrement utilisées.

Les souches de levures transformées par les plasmides sont cultivées en erlenmeyers ou en fermenteurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en milieu riche (YPD: 1 % extrait de levure, 2 % Bactopeptone, 2 % glucose; ou YPL: 1 % extrait de levure, 2 % Bactopeptone, 2 % lactose) sous agitation constante.

5

EXEMPLES

I - Isolement du fragment BglII-BamHI de 3 kb de *K. lactis*.

La séquence SEQ ID n° 1 a été isolée à partir d'une banque de fusion entre des fragments du génome de *K.lactis* 2359/152 et le gène *lacZ* de *E.coli*. Cet exemple décrit en (A) la préparation de la banque de fusion, et en (B) la sélection et la caractérisation d'un clone de cette banque portant la séquence promotrice SEQ ID n° 1 de *K.lactis*.

10

A/ Préparation de la banque de fusion

A.1. Préparation du transposon Mini Mu MudIIK1 (figures 1 et 2).

Le Mini Mu MudIIK1 a été construit à partir du Mini Mu MudIIK1 décrit par Daignan-Fornier et Bolotin-Fukuhara (Gene 62 (1988) 45). Il a été obtenu en substituant l'origine de répllication du mini transposon MudIIK1 par une origine de répllication fonctionnelle dans *Kluyveromyces* : l'origine de répllication du plasmide pKD1 (EP231 435).

15

A.1.1. Construction d'une cassette portant l'origine de répllication du plasmide pKD1 (fragment S11).

20

Afin de faciliter les manipulations ultérieures, le fragment S11 (portant l'origine de répllication du plasmide pKD1) a été mis sous forme d'une cassette NotI. Pour cela, un dérivé du plasmide pUC18 a été construit dans lequel les sites externes du multisite de clonage (sites HindIII et EcoRI) ont été changés en sites NotI. Cela a été fait par digestion avec l'enzyme correspondante, action de l'enzyme de Klenow et ligature avec un oligonucléotide synthétique correspondant à un site NotI [oligo d(AGCGGCCGCT); Biolabs]. Le plasmide obtenu est désigné pGM67. Le fragment S11 de 960 pb obtenu par digestion par l'enzyme Sau3A du plasmide KEp6 (Chen et al, Nucl. Acids Res. 114 (1986) 4471) a ensuite été inséré au site compatible BamHI

25

du plasmide pGM67. Le plasmide ainsi obtenu désigné pGM68 contient, sous forme d'une cassette NotI, le fragment S11.

A.1.2. Suppression de l'origine de répllication 2μ du transposon MudIIZZ1.

5 Le plasmide pGM15 portant le mini Mu MudIIZZ1 (Daignan-Fornier et Bolotin-Fukuhara précitée) a été délété des régions 2μ par digestion au moyen de l'enzyme SalI. Le site SalI unique ainsi obtenu a ensuite été transformé en site NotI par ligature d'un oligonucléotide synthétique correspondant à un site NotI après action de l'enzyme de Klenow. Le plasmide résultant est appelé pGM59.

A.1.3. Insertion du fragment S11

10 La cassette NotI portant l'origine de répllication du plasmide pKD1 (fragment S11), provenant du plasmide pUC18 modifié a ensuite été introduite au site NotI unique du plasmide pGM59.

15 Le plasmide obtenu, désigné pGM83, porte un mini Mu, appelé MudIIK1, qui est adapté à la levure *Kluyveromyces lactis*, ainsi qu'une copie fonctionnelle du gène LEU2 de *S.cerevisiae* capable de compléter une mutation leu2 chez *K.lactis* (Kämper et al, Curr. Genet. 19 (1991) 109). La carte de restriction du mini-mu MudIIK1 est représentée sur la figure 2.

A.2. Introduction du Mini Mu MudIIK1 dans la souche *E.coli* portant le Mu helper JM109::(Mu_{cts}) : Obtention de la souche JM109::(Mu_{cts})::(MudIIK1).

20 La souche JM109::(Mu_{cts}) a été transformée par le plasmide pGM83 contenant le mini mu MudIIK1 en présence de chlorure de calcium. Après transformation, la transposition a été induite par choc thermique selon la technique décrite par Castilho et al. (J. Bacteriol. 158 (1984) 488). Le lysat phagique obtenu après induction est ensuite utilisé pour surinfecter la souche JM109::(Mu_{cts}). La souche JM109::(Mu_{cts}) étant recA, l'ADN linéaire encapsidé par le phage ne peut se refermer pour donner un plasmide répliatif. Les intégrants [souche JM109::(Mu_{cts})::(MudIIK1)] sont donc sélectionnés comme clones chloramphénicol résistants (Cm^R), ampicilline sensibles (Amp^S).

A.3. Préparation de la banque génomique de *K.lactis* dans *E.coli* DH1

L'ADN de haut poids moléculaire a été préparé à partir de la souche *K.lactis* 2359/152, et digéré partiellement par l'enzyme Sau3A. Les fragments d'une taille de 4 à 8 kb ont été récupérés sur gel d'agarose LMP ("Low Melting Point", SEAKEM) et clonés dans le plasmide pBR322 linéarisé par BamHI et déphosphorylé par action de la phosphatase intestinale de veau (Biolabs). 35 pools de 1000 colonies dans *E.coli* DH1 ont ainsi été réalisés. Les 1000 colonies de chaque pool sont ampicilline-résistantes et tétracycline-sensibles, ce qui montre qu'elles ont toutes inséré un fragment d'ADN génomique de *K.lactis* dans pBR322.

A.4. Préparation de la banque de fusion

10 A.4.1. Introduction de la banque génomique de *K.lactis* dans la souche JM109::(Mu_{cts})::(MudII_{ZK1}).

L'ADN plasmidique de chaque pool réalisé dans DH1 est extrait (Maniatis). Cet ADN est ensuite utilisé pour transformer la souche JM109::(Mu_{cts})::(MudII_{ZK1}) en présence de chlorure de calcium. Pour être représentatif des 1000 colonies contenues dans chaque pool de la banque génomique, plus de 3000 clones par pool ont été récupérés dans la souche JM109::(Mu_{cts})::(MudII_{ZK1}) permettant la transduction.

A.4.2. Transposition du Mini Mu MudII_{ZK1}

La banque de fusion est réalisée par transposition extensive du Mini Mu MudII_{ZK1} sur les plasmides formant la banque d'ADN génomique de *K.lactis*. Les mini-muductions ont été faites selon le protocole décrit par Castilho et al. (J. Bacteriol. 158 (1984) 488) et les transductants ont été sélectionnés sur milieu sélectif LBAC (milieu LB (Gibco BRL) supplémenté avec 50 mg/l d'ampicilline et 30 mg/l de chloramphénicol), le marqueur Amp^R étant apporté par le plasmide, et le marqueur Cm^R par le mini-mu. Pour chaque pool, des transpositions sont faites en série; et entre 10 000 et 20 000 transductants sont récupérés par pool. L'ADN des transductants est ensuite extrait d'une préparation de 100 ml, purifié par précipitation au polyéthylène glycol (Maniatis et al, 1989) et resuspendu dans 100µl d'eau. Cet ADN a ensuite été utilisé pour transformer *K.lactis* et sélectionner des clones portant des promoteurs.

B/ Isolement du fragment BglII-BamHI de *K.lactis*

L'ADN de fusion préparé ci-dessus a été utilisé pour transformer, par électroporation, une souche réceptrice de *K.lactis*. Cette souche réceptrice, désignée SD6, porte les mutations *leu2* (correspondant au marqueur de sélection du mini-mu MudIIK1) et *lac4-8*. Cette dernière mutation empêche la souche de pousser sur un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone, mais elle peut être complémentée par la surexpression du gène *lacZ* d'*E.coli* codant pour la β -galactosidase (Chen et al., J. Basic Microbiol. 28 (1988) 211). De ce fait, l'expression d'une protéine fusionnée à la β -galactosidase doit permettre la croissance de la souche SD6 sur lactose après transformation. Ce crible positif a été utilisé pour sélectionner rapidement des clones portant des promoteurs forts.

B.1. Construction de la souche réceptrice *K.lactis* SD6.

La souche SD6 (Chen et al., Mol. Gen. Genet. 233 (1992) 97) a été obtenue par croisement de la souche *K.lactis* CXJ1-7A (a, *lac4-8*, *ura3A*, *ade1-1*, K1, K2, pKD1) (Chen et Fukuhara, Gene 69 (1988) 181) avec la souche AWJ-137 (*leu2*, *trp1*, homothallique) (Kämper et al, Curr. Genet. 19 (1991) 109), et sélection des spores ayant le génotype ADE⁺, *uraA*, *leu2*, *lac4-8*. Comme les spores obtenues n'étaient pas capables de régénérer après transformation par protoplastes, un croisement retour a été fait avec la souche CXJ1-7A. Après sporulation en masse, les spores du génotype choisi ont été testées par transformation au chlorure de lithium avec le plasmide KEp6 selon une technique dérivée de celle décrite par Ito et al. (J. Bacteriol. 153 (1983) 163) (la concentration en LiCl est de 20 mM, soit 10 fois moins que celle utilisée par Ito pour *S.cerevisiae*). La souche CXJ1-7A a servi de témoin de transformation.

La souche SD6, sélectionnée sur ces critères, se transforme correctement : 1 à 3 . 10⁴ transformants par μ g d'ADN; et les transformants ont une stabilité satisfaisante : 30 à 40 % des colonies gardent le phénotype [Ura⁺] après 6 générations en milieu non sélectif.

B.2. Isolement du fragment BglII-BamHI.

La souche SD6 a été transformée par électroporation selon Becker et Garante (in Methods in Enzymology vol194 (1991) 182) (appareil Jouan ;

2500 V/cm; 80-100 ng d'ADN/transformation) avec l'ADN de 11 pools de transductants obtenus en A.4.2. (correspondant à une banque de 11000 clones dans *E.coli*). Après 5 heures de régénération en milieu YPD (extrait de levure 10 g/l ; peptone 10 g/l ; glucose 20 g/l), les cellules ont été étalées sur milieu minimum lactose. Les transformants capables de pousser sur lactose ont été restriés et, pour chaque clone, le plasmide a été extrait, amplifié dans *E.coli*, et, après vérification rapide de la carte de restriction du vecteur et du mini-mu, utilisé pour retransformer la levure SD6. Parmi les clones de *K.lactis* obtenus après retransformation, l'un d'entre-eux, le clone 2C5, a été étudié par restriction (voir figure 3) et par analyse de la séquence de la jonction entre la protéine de *K.lactis* et la β -galactosidase. Pour cela, la séquence de la jonction, à partir de l'extrémité lacZ du mini-mu (séquence double brin) a été déterminée par séquençage, au moyen de l'oligonucléotide suivant situé à -59 nucléotides de la jonction :

5'-CTGTTTCATTTGAAGCGCG-3'

L'analyse de la séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique ainsi obtenue par comparaison avec les séquences de banques de protéines d'autres levures ou eucaryotes (Genbank, MIPS, EMBL, etc), montre que la séquence portée par le clone 2C5 correspond à un gène impliqué dans le transport de sucres. Le fragment BglIII-BamHI de 3 kb contenant la région en amont de la fusion a ensuite été sous-cloné dans le vecteur Bluescript KS+ (Stratagène), une carte de restriction a été faite (figure 4), et la séquence a été déterminée par délétions séquentielles sur 1 kb (SEQ ID n° 1). L'obtention d'éléments de séquence permet également à l'homme du métier de préparer des sondes spécifiques et de recloner la région promotrice de l'invention par hybridation selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

II - Transformation de *Kluyveromyces*.

Différentes techniques permettant l'introduction d'ADN dans la levure peuvent être utilisées.

Avantageusement, les différentes souches de *Kluyveromyces* utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. (J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168). La technique de transformation décrite par Durrens et al. (Curr.Genet. 18 (1990) 7) utilisant l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde a également été utilisée.

Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, par exemple selon la méthode décrite par Karube et al. (FEBS Letters 182 (1985) 90).

Un protocole alternatif a encore été décrit en détail dans la demande EP 361 991.

5 **III - Utilisation du promoteur de la SEQ ID n° 1 pour l'expression de gènes hétérologues.**

L'activité de promoteur transcriptionnel de la région de *K.lactis* décrite sur la séquence SEQ ID n° 1 a été mise en évidence lors même de son isolement, par sa capacité à induire la complémentation de la mutation lac4-8 de la souche SD6. Cette
10 capacité résulte en effet de l'expression du gène lacZ de *E.coli*, et démontre par là même la capacité d'expression de gènes hétérologues.

IV - Construction d'un promoteur portable

Un promoteur portable est préparé par PCR, par insertion sur le fragment BglII-BamHI de 3 kb d'un site de restriction en position +1 par rapport au codon
15 ATG.

L'insertion de ce site permet de générer un fragment comprenant la région promotrice et d'introduire en aval du promoteur ainsi obtenu tout gène que l'on désire exprimer.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON

(C) VILLE: ANTONY

10

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PROMOTEUR DE LEVURE ET SON
UTILISATION.

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

20

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1119 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

30

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: Kluyveromyces lactis

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

40

(B) EMBLACEMENT: 1018..1119

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

45

GAACTAAACT CAAAATTTT AGTAAGGAAA TATTCGACT GGCTATTTCC
TCGGTCCCCA 60

TCTGACATGT CACGGAAAAA CTGTTCCCCA GAAATTTTTC TTCCCCGCC
 AGATTCTTTT 120

5 AAGACGTAAC AAATATGAGA AATGACTTTG CACACAGAAA CATTTCAGC
 AGTTTTCCGA 180

AGACATACAG CAAAACCGCC ATCTCAGAAA TGAAAAAGTA ATTTTCAGGGA
 ACTGAAAAAG 240

10 TTCGACGATT CGTAATTTAC ATTTTCGTATC ACTTTCATCA GCAGACCGAC
 AGACAGGCTA 300

GTGATTGTTT CGTATTGCTA ATTTGGTGTC ATTGTTGCAA CTCGGTCATT
 15 ATTACACCTT 360

GAAGGGGTGG CTGGTTTCGT TAGTCAGGAG GATTATACTC CGGTCAGCGG
 AATGTAACGC 420

20 CATTTACAAA CGATATTATC AATGGTATAG TTGGGCTGGA AGAAAAGTGA
 CAGGACCCAG 480

AATTCCGAGC AGTGAGTGAG AACGGTAATG TTGAGGATTG TAGTGTTTTT
 CTTTTATTGA 540

25 TAGAAGATGC TCATCGCATC GTCGTGTTCC GTGAAAGCTC TCCATGTTAG
 AAAGTCCACC 600

GTTGCCAGTT GGCAGGCTGT ATCCTCCCCG CTCTTCCTTG GTGCCGGATT
 30 TTCTTTAGCT 660

CCTTACACAA TGACGCTTTG GGACAATGTT TCGTTATTCC ATCGACGATG
 TTGCCCCAGA 720

35 CTAATTAATC AACGGGCTAA GAAATTAGCG TAACTGATGT AGAATGATCA
 GAGGGTTTTT 780

TTTTCTTTCT TAGTTCTATT TACACTATTT TCCAGCTTGA ATGGTTTAAG
 ATTTAATCCG 840

40 TTGTTTCTGA TATAAAAGCC AGGTAATAAA CCTTCTAACT TGCCTCTTCT
 TGGTGTCGAT 900

TCGAAAACAC TTTTCGGTTG TTTGTTTCTG TTTTTTCCC TTTCGATTCA
 45 ATAACCCAAT 960

TAAAAAACGT ATTATAACAA ACTATAACAA ACATCAACTT TAGCTAATAA
CAACAAA 1017

5 ATG TCA TTG AAA AAT TGG CTT TTG CTA CGT GAT ATC CAA TAC GAG GGA
1065

Met Ser Leu Lys Asn Trp Leu Leu Leu Arg Asp Ile Gln Tyr Glu Gly
1 5 10 15

10 ACG TTT TAT AAA AAG TTC CCC CAT GTC TAC AAC ATT TAC GTC ATC GGT
1113

Thr Phe Tyr Lys Lys Phe Pro His Val Tyr Asn Ile Tyr Val Ile Gly
20 25 30

15 TTC ATA 1119
Phe Ile

REVENDICATIONS

1. Fragment d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire, ou d'un dérivé de celles-ci, et possédant une activité de promoteur transcriptionnel.
- 5 2. Fragment d'ADN comprenant tout ou partie du fragment BglII-BamHI de 3 kb présenté sur la figure 4.
3. ADN recombinant comprenant un fragment d'ADN selon la revendication 1 ou 2.
4. ADN recombinant selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il contient
10 en outre un ou plusieurs gènes de structure.
5. ADN recombinant selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il contient également des signaux permettant la sécrétion du produit d'expression du ou desdits gènes de structure.
6. ADN recombinant selon les revendications 4 et 5 caractérisé en ce que le
15 ou les gènes de structure codent pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire.
7. ADN recombinant selon la revendication 6 caractérisé en ce que le ou les gènes de structure codent pour des protéines choisies parmi les enzymes (tels que
20 notamment la superoxyde dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine etc.), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur de von Willebrand, la fibronectine, l'alpha-1 antitrypsine etc.), l'insuline et ses variants, les lymphokines (telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), le TNF, le TRF etc.), les facteurs de
25 croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, le FGF, l'EGF, le PDGF, le TGF etc.), les apolipoprotéines, des polypeptides antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Eppstein-Barr, herpes etc.), ou encore des fusions de polypeptides telles que notamment des fusions comportant une partie active fusionnée à une partie stabilisatrice (par exemple des fusions entre

l'albumine ou des fragments d'albumine et le récepteur ou une partie d'un récepteur de virus (CD4, etc.)).

5 8. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 3 à 7 caractérisé en ce qu'il fait partie d'un plasmide d'expression, qui peut être à répllication autonome ou intégratif.

9. Cellule recombinée contenant une séquence d'ADN ou un ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications précédentes.

10. Cellule recombinée selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

10 11. Cellule recombinée selon la revendication 10 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre *Kluyveromyces*.

12. Utilisation d'une séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour l'expression de gènes recombinés.

15 13. Utilisation selon la revendication 12 pour l'expression de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire.

14. Procédé de production de protéines recombinantes caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinée selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 et on récupère les protéines produites.

20 15. Procédé selon la revendication 14 pour la production de protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire.

16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que la protéine est préférentiellement la sérum-albumine humaine ou un de ses variants moléculaires.

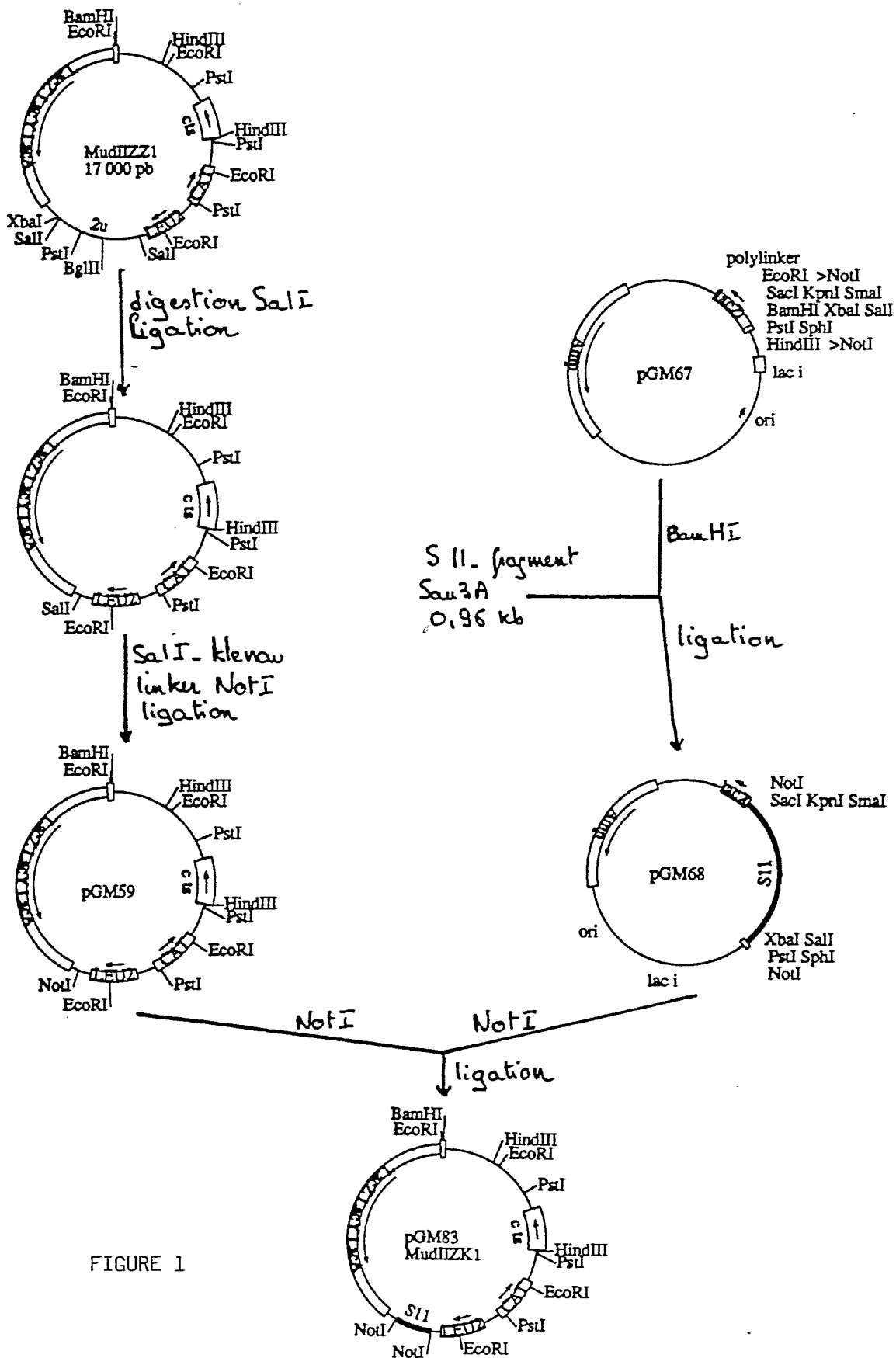


FIGURE 1

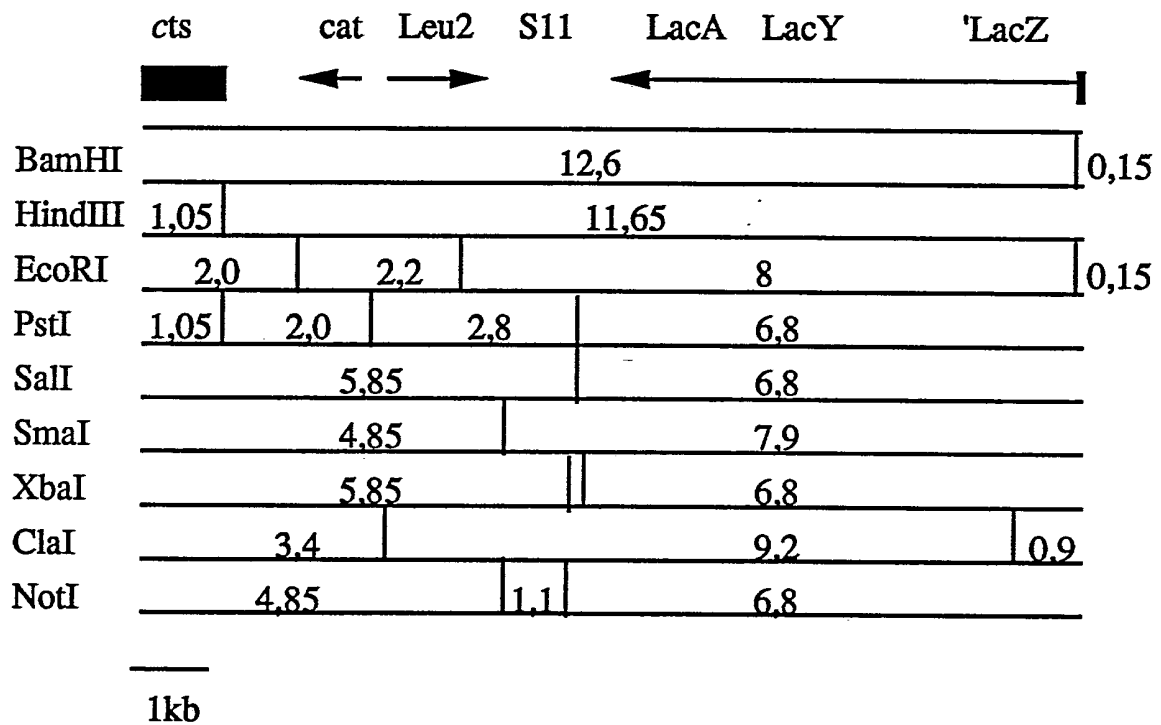


FIGURE 2

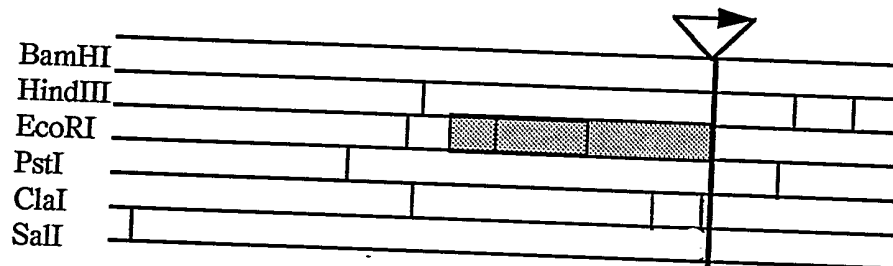


FIGURE 3

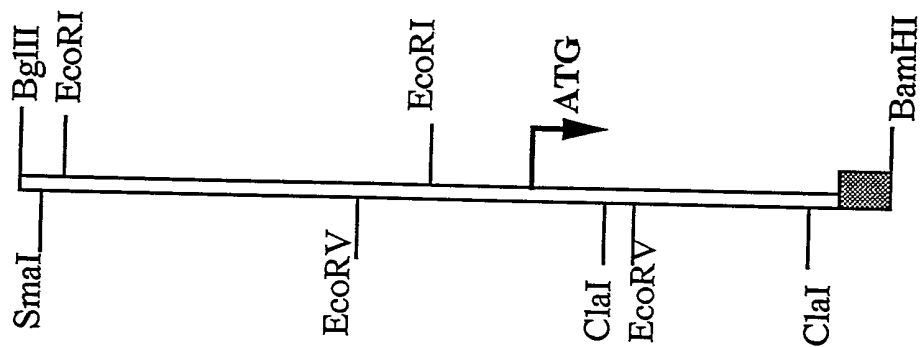


FIGURE 4

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 487845
FR 9307164

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, Y	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS vol. 233 , 1992 , BERLIN DE pages 97 - 105 XIN JIE CHEN ET AL. 'Glucose transport in the yeast Kluyveromyces lactis' * page 99 - page 100 * ---	1-3
Y	EP-A-0 148 668 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 17 Juillet 1985 * page 3 * * page 11-12 * ---	1-3
A	EP-A-0 511 912 (RHONE-POULENC RORER SA) 4 Novembre 1992 * exemples 1-2 * ---	
A	WO-A-93 04176 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 4 Mars 1993 * exemples 1,2 * ---	
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 16, no. 16 , Août 1988 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 8011 - 8028 WEBSTER, T. D. ET AL. 'The organization and transcription of the galactose gene cluster of Kluyveromyces lactis' * figure 3 * ---	
E	FR-A-2 693 475 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 14 Janvier 1994 * page 15 - page 16; figures 1,2 * -----	1-16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
		C12N C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
15 Mars 1994		Espen, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 1503 03.82 (POMC13)