



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 672 790 A5

⑤① Int. Cl. 4: C 07 H 21/04
C 12 N 15/00
A 61 K 45/05

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

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑳ Numéro de la demande: 1497/85

㉗ Titulaire(s):
Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha,
Osaka-shi/Osaka (JP)

㉔ Date de dépôt: 04.04.1985

㉓ Priorité(s): 06.04.1984 US 597372

㉘ Inventeur(s):
Wallace, Robert Bruce, West Covina/CA (US)
Itoh, Hirataka, Fiji-shi/Shizuoka-ken (JP)

㉒ Brevet délivré le: 29.12.1989

㉕ Fascicule du brevet
publié le: 29.12.1989

㉙ Mandataire:
Bovard AG, Bern 25

⑤④ Acide désoxyribonucléique comprenant une séquence de base codant un polypeptide physiologiquement actif humain et ce polypeptide.

⑤⑦ L'acide désoxyribonucléique est capable de coder un polypeptide physiologiquement actif humain, particulièrement un facteur de nécrose de tumeur humain (FNT humain), qui comprend une séquence spécifique d'acides aminés de 155 résidus d'acides aminés; la séquence de bases de l'ADN codant le FNT humain a été déterminée en utilisant l'ADNc du FNT du lapin. Le FNT humain peut être avantageusement produit à grande échelle par technique d'ADN recombinant. Le FNT humain s'est révélé être excellent pour induire la nécrose des tumeurs sans effet toxique sur les tissus normaux du corps vivant.

REVENDICATIONS

1. Acide désoxyribonucléique capable de coder un polypeptide humain ayant une activité de facteur de nécrose de tumeur, acide ayant la séquence d'acides aminés représentée par la formule (I):

Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala
Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu
Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu

TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA
GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG
GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC
CTC TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC
CAC ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC
CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG
GGG GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG
GTC TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT
CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT
GGG ATC ATT GCC CTG

où A indique un résidu d'acide 2'-désoxyadénylique, G un résidu d'acide 2'-désoxyguanylique, C un résidu d'acide 2'-désoxycytidylique et T un résidu d'acide thymidylique, et en ce que l'extrémité gauche et l'extrémité droite de la formule (II) représentent le côté du groupe 5'-hydroxyle et le côté du groupe 3'-hydroxyle, respectivement, ou comprend une séquence de bases qui est obtenue en substituant au moins une base de ladite séquence selon la dégénération du code génétique.

3. Acide désoxyribonucléique selon la revendication 1, sensiblement pur, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence de bases codant un polypeptide ayant une activité de FNT humain.

4. Acide désoxyribonucléique selon la revendication 1, sensiblement pur, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence définie à la revendication 2.

5. ADN recombinant répliquable, caractérisé en ce qu'il comprend un acide désoxyribonucléique selon la revendication 1 et un véhicule d'expression répliquable.

6. ADN recombinant répliquable selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend un acide désoxyribonucléique selon la revendication 2.

7. Micro-organisme ou culture de cellules, caractérisé en ce qu'il est transformé par un ADN recombinant répliquable selon la revendication 5.

8. Micro-organisme selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est transformé par un ADN recombinant répliquable selon la revendication 6.

9. Micro-organisme selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'*Escherichia coli* K-12 souche JM83 (pHGE), avec le numéro d'accèsion ATCC39656.

10. Vecteur de transfert de plasmide ou de bactériophage, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence de bases codant un polypeptide défini à la revendication 1.

11. Vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence de bases codant un polypeptide ayant une activité de FNT humain.

12. Vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pHGE.

13. Culture de micro-organismes ou de cellules, caractérisée en ce qu'elle est transformée par le vecteur de transfert de la revendication 10 et ses mutants ou variantes.

où Gln indique un résidu de glutamine, Asp un résidu d'acide aspartique, Pro un résidu de proline, Tyr un résidu de tyrosine, Val un résidu de valine, Lys un résidu de lysine, Glu un résidu d'acide glutamique, Ala un résidu d'alanine, Asn un résidu d'asparagine, Leu un résidu de leucine, Phe un résidu de phénylalanine, Gly un résidu de glycine, His un résidu d'histidine, Ser un résidu de sérine, Thr un résidu de thréonine, Ile un résidu d'isoleucine, Trp un résidu de tryptophane, Arg un résidu d'arginine, Met un résidu de méthionine et Cys un résidu de cystéine.

2. Acide désoxyribonucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence choisie dans le groupe consistant en une séquence de bases représentée par la formule (II) qui suit et une séquence des bases complémentaires de ladite séquence de bases:

14. Culture de micro-organismes ou de cellules, caractérisée en ce qu'elle est transformée par le vecteur de transfert selon la revendication 11 et ses mutants ou variantes.

DESCRIPTION

La présente invention se rapporte à un acide désoxyribonucléique (appelé ci-après «ADN») codant un nouveau polypeptide physiologiquement actif pour les êtres humains. L'invention se rapporte également à un ADN recombinant répliquable contenant l'ADN, un micro-organisme, ou cellule, transformé par l'ADN recombinant répliquable, un nouveau polypeptide physiologiquement actif, humain, obtenu en exprimant l'ADN, un polypeptide physiologiquement actif, sensiblement pur, humain, ayant la séquence d'acides aminés décrite ici. Plus particulièrement, la présente invention concerne un ADN codant le FNT humain (Facteur de Nécrose de la Tumeur), FNT humain ayant une séquence d'acides aminés déduite de la séquence de bases de l'ADN, un procédé de production de FNT humain à partir de l'ADN en utilisant la technologie de l'ADN recombinant, et l'utilisation du produit obtenu par le procédé.

Dans la présente description, les acides aminés et les peptides sont représentés en utilisant des abréviations, comme indiqué ci-dessous, approuvées par la Commission IUPAC-IUB sur la Nomenclature Biochimique (CBN). Par ailleurs, pour les acides aminés et analogues ayant des isomères, ceux représentés par les abréviations qui suivent sont de la configuration L, à moins que cela ne soit spécifié autrement.

Gln: résidu de glutamine
Asp: résidu d'acide aspartique
Pro: résidu de proline
Tyr: résidu de tyrosine
Val: résidu de valine
Lys: résidu de lysine
Glu: résidu de l'acide glutamique
Ala: résidu d'alanine
Asn: résidu d'asparagine
Leu: résidu de leucine
Phe: résidu de phénylalanine

Gly: résidu de glycine
 His: résidu d'histidine
 Ser: résidu de sérine
 Thr: résidu de thréonine
 Ile: résidu d'isoleucine
 Trp: résidu de tryptophane
 Arg: résidu d'arginine
 Met: résidu de méthionine
 Cys: résidu de cystéine

Les polydésoxyribonucléotides et oligodésoxyribonucléotides sont représentés par les séquences des résidus de désoxynucléotide qui ont les abréviations suivantes:

A: résidu d'acide 2'-désoxyadénylique
 C: résidu d'acide 2'-désoxycytidylique
 G: résidu d'acide 2'-désoxyguanylique
 T: résidu d'acide thymidylique

A moins que cela ne soit spécifié autrement, l'extrémité gauche de la séquence des désoxynucléotides est l'extrémité 5'.

On connaît diverses substances ayant la capacité de stimuler le système réticulo-endothélial, par exemple les substances physiologiquement actives ayant une activité antitumeur, qui sont induites par diverses bactéries Gram positif et endotoxines. Plus particulièrement, Carswell et autres ont découvert que le sérum de la souris suisse CD-1 infectée du bacille de Calmette-Guérin (BCG) avait au bout de deux semaines, avec ensuite injection intraveineuse d'endotoxine, une activité cytotoxique contre les cellules L en culture, et ils ont également découvert un phénomène selon lequel il induisait la nécrose hémorragique du sarcome Meth-A transplanté chez la souris (BALB/c × C57BL/6)F₁. Ils ont donné le nom de FNT (Facteur de Nécrose de la Tumeur) à la substance active dans le sérum [«Proc. Nat. Acad. Sci. EUA», vol. 72 (N° 9), pp. 3666-3670 (1975)]. Ensuite, Ruff et autres ont rapporté que le FNT du lapin préparé selon la méthode susmentionnée proposée par Carswell et autres était purifié environ 2000 fois par rapport au sérum [«J. Immunology», vol. 125 (N° 4), pp. 1671-1677 (1980)]. Par ailleurs, Matthews et autres ont rapporté que le FNT du lapin était purifié environ 1000 fois par rapport au sérum [«Br. J. Cancer», vol. 42, pp. 416-422 (1980)]. Cependant, dans les ouvrages de Ruff et autres et de Matthews et autres, l'effet de nécrose de la tumeur par rapport au FNT purifié n'est pas confirmé dans des expériences sur animaux.

La divulgation du brevet japonais N° 57-140725 (1982) révèle un procédé pour isoler et purifier une substance physiologiquement active protéinée ayant une activité antitumeur, qui est induite en administrant à un mammifère, tel qu'une souris, un lapin ou un cobaye, au moins une substance ayant la capacité de stimuler le système réticulo-endothélial, puis en injectant l'endotoxine d'une bactérie Gram négatif au mammifère, ou en ajoutant l'endotoxine d'une bactérie Gram négatif à une culture de tissus contenant les macrophages activés d'un mammifère. Dans cette description de brevet japonais sont également révélés le poids moléculaire et le point isoélectrique de la substance physiologiquement active protéinée, purifiée (poids moléculaire, 39 000 ± 5000 en mesurant par filtration sur gel et électrophorèse au gel de polyacrylamide-SDS; point isoélectrique, pH 3,9 ± 0,3 en mesurant par focalisation isoélectrique), mais aucune structure détaillée de la substance physiologiquement active protéinée.

Par ailleurs, Matthews a rapporté que l'on obtenait une substance ayant une activité cytotoxique contre les cellules L par un procédé où l'on injecte BCG à un lapin, et des phagocytes mononucléaires de divers tissus du lapin sont obtenus deux semaines après l'injection, avec ensuite addition d'endotoxine à la culture des cellules des phagocytes mononucléaires [«Br. J. Cancer», vol. 44 (3), pp. 418-424 (1981)]. Cependant, dans son rapport, la structure détaillée de la substance obtenue n'est pas révélée et, par ailleurs, il n'y a aucune preuve montrant que la substance obtenue est identique au FNT que l'on trouve dans le sérum.

Par ailleurs, il y a un certain nombre de publications imprimées rapportant des facteurs ayant une bioactivité ressemblant au FNT,

ou une bioactivité semblable à celle du FNT. Par exemple, Reed et autres ont trouvé un tel facteur dans des macrophages et analogues présents dans le sang périphérique humain [«J. Immunology», vol. 115, p. 395 (1975)], Matthews et autres dans des cellules de leucémie dérivées des monocytes du sang périphérique humain ou d'un patient souffrant de leucémie monocytique myélogène [«J. Immunology», vol. 44, p. 135 (1981)], D. Barbara dans les cellules humaines B transformées par le virus d'Epstein-Barr [«Proc. Nat. Acad. Sci. EUA», vol. 80, p. 5397 (1983)], et B. Bharat dans la lignée de cellules de lymphoblastoïdes 1788. Les facteurs susmentionnés sont également révélés dans les descriptions de brevets japonais N° 58-15921 (1983), 58-21621 (1983), 58-107197 (1983) et 58-225024 (1983) et les descriptions de brevets britanniques N° 2 106 117 et 2 117 385. Cependant, les cellules ou lignées de cellules pouvant efficacement produire de tels facteurs n'ont pas encore été trouvées. Par ailleurs, en ce qui concerne ces facteurs, il y a de nombreux points à élucider, comme leur structure et leurs propriétés.

Ito [brevet japonais N° 58-251817 (1983)] a effectué des études sur les propriétés et la structure du FNT du lapin et des cellules produisant le FNT du lapin. Par suite, il a obtenu des cellules capables de produire une substance ayant une activité cytotoxique contre les cellules L en administrant une substance ayant la capacité de stimuler le système réticulo-endothélial à un lapin, avec ensuite injection d'endotoxine dérivée d'une bactérie dans le lapin, et il a obtenu ensuite une telle substance en utilisant les cellules L. Il a également affirmé que le poids moléculaire et les propriétés immunologiques de la substance ayant une activité cytotoxique contre ces cellules-là obtenue en utilisant les cellules obtenues ci-dessus étaient en accord avec ceux du FNT obtenu du sérum du lapin. Par ailleurs, avec la progression des techniques de manipulation génétique, il est devenu possible de déterminer la structure d'une protéine tant qu'un ADN codant la protéine est obtenu sous forme isolée. Cela est ainsi, parce que la structure de l'ADN isolé peut être déterminée et, alors, la structure de la protéine peut être déduite de la structure de l'ADN. Par ailleurs, il est devenu possible de produire une protéine à partir d'un ADN codant la protéine en utilisant une culture de micro-organismes ou de cellules. Ito a appliqué les techniques de manipulation génétique susmentionnées aux cellules capables de produire une substance ayant une activité cytotoxique contre les cellules L. Par suite, il a réussi à isoler un ADN codant le FNT du lapin, à déterminer les structures de l'ADN et du FNT du lapin et à produire le FNT du lapin en utilisant l'ADN.

Comme cela est mis en évidence par ce qui précède, Ito a bien réussi dans la production de FNT du lapin. Cependant, il faut noter que l'administration du FNT à un animal qui n'est pas l'origine du FNT présente un danger de provoquer un choc anaphylactique. Cela est ainsi, parce que le FNT est un polypeptide et, par conséquent, lorsque l'on administre le FNT à un animal qui n'est pas l'origine du FNT, le FNT fonctionne en tant qu'antigène pour produire un anticorps. Pour cette raison, lorsque le FNT est destiné à être administré à un corps humain, l'utilisation du FNT dérivé d'êtres humains est tout à fait préférable. Cependant, même la structure du FNT humain n'a pas encore été élucidée avec succès. Par conséquent, la détermination de la structure de l'ADN codant le FNT humain est fortement nécessaire.

Les présents inventeurs ont effectué des études intensives sur la structure de l'ADN codant le FNT humain. Par suite, les présents inventeurs ont trouvé de manière surprenante qu'un gène de polypeptide humain et un gène de FNT de lapin peuvent être clonés en utilisant l'ADNc du lapin comme échantillon, que l'ADN codant le polypeptide humain peut être isolé avec soin et que sa structure peut être déterminée par comparaison entre le gène de FNT du lapin, le gène de polypeptide humain et l'ADNc du lapin par rapport à l'homologie de leurs séquences de base, que la structure de l'ADN pur codant le polypeptide humain peut être déterminée soigneusement et qu'un tel ADN pur peut être obtenu, et qu'un polypeptide humain produit en utilisant l'ADN codant le polypeptide humain a une activité cytotoxique contre les cellules L.

La présente invention est basée sur ces nouvelles découvertes.

Par conséquent, la présente invention a pour objet un acide désoxyribonucléique codant un polypeptide humain physiologiquement actif.

La présente invention a pour autre objet un ADN recombinant répliquable comprenant un ADN codant le FNT humain et un véhicule d'expression répliquable.

La présente invention a pour autre objet un micro-organisme, ou une cellule, transformé par un ADN recombinant du type susmentionné.

L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description explicative qui va suivre, faite en référence aux dessins schématiques annexés donnés uniquement à titre d'exemples illustrant plusieurs modes de réalisation de l'invention et dans lesquels:

— la figure 1 illustre les cartes de restriction des insertions de plasmide, contenant chacun un ADN codant un polypeptide physiologiquement actif conventionnel du lapin;

— la figure 2 illustre l'organigramme du procédé de préparation d'un ADN recombinant (pFNT-lac-1) codant le polypeptide physiologiquement actif du lapin conventionnel;

— la figure 3 montre l'organigramme du procédé de préparation d'un autre ADN recombinant (pFNT-lacUV5-1) codant le polypeptide physiologiquement actif conventionnel du lapin;

— la figure 4 montre la carte de restriction de la portion d'un plasmide contenant un gène pour un polypeptide physiologiquement actif, humain, de la présente invention;

— la figure 5 illustre la carte de restriction de la portion d'un plasmide contenant un gène pour un polypeptide physiologiquement actif de lapin conventionnel;

— la figure 6 montre l'organigramme du procédé de préparation d'un ADN recombinant (pHFNT-lacUV5-1) codant un polypeptide physiologiquement actif, humain, de la présente invention, et

— la figure 7 montre l'organigramme du procédé de préparation d'un autre ADN recombinant (pHFNT-lacUV5-2) codant le polypeptide physiologiquement actif, humain, de la présente invention.

Le polypeptide physiologiquement actif, humain, possède une séquence d'acides aminés représentée par la formule (I) qui suit:

```

TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA
GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG
GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC
CTC TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC
CAC ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC
CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG
GGG GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG
GTC TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT
CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT
GGG ATC ATT GCC CTG
  
```

où A indique un résidu d'acide désoxyadénylique, G un résidu d'acide désoxyguanylique, C un résidu d'acide désoxycytidylique et T un résidu d'acide thymidylique, et où l'extrémité gauche et l'extrémité droite de la formule (II) représentent le côté du groupe 5'-hydroxyle et le côté du groupe 3'-hydroxyle, respectivement.

Selon une manière spéciale de l'exécution de la présente invention, l'ADN comprend une séquence de bases ayant ATG (A, T et G sont tels que mentionnés ci-dessus) attaché à l'extrémité 5' de la séquence de bases susmentionnée, afin de produire du FNT humain mûr au moyen d'une culture d'un micro-organisme ou d'une cellule. De préférence, l'ADN de la présente invention comprend également un ADN ayant un ADN à côté de la position 5' codant un signal partiel ou entier de peptide du FNT humain.

La structure d'un ADN et la structure du polypeptide qui en est déduite peuvent être partiellement changées par mutation naturelle

Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu
5 Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala
Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu
10 Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
où Gln indique un résidu de glutamine, Asp un résidu d'acide aspartique, Pro un résidu de proline, Tyr un résidu de tyrosine, Val un résidu de valine, Lys un résidu de lysine, Glu un résidu d'acide glutamique, Ala un résidu d'alanine, Asn un résidu d'asparagine, Leu un résidu de leucine, Phe un résidu de phénylalanine, Gly un résidu de glycine, His un résidu d'histidine, Ser un résidu de sérine, Thr un résidu de thréonine, Ile un résidu d'isoleucine, Trp un résidu de tryptophane, Arg un résidu d'arginine, Met un résidu de méthionine et Cys un résidu de cystéine.

Le polypeptide physiologiquement actif, humain, codé par l'ADN de la présente invention, comprend également un polypeptide ayant un acide aminé méthionine attaché au terminus N de la séquence susmentionnée d'acides aminés et un intermédiaire ayant un signal partiel ou entier de peptide pour le FNT humain attaché au terminus N de la séquence susmentionnée d'acides aminés. Il est possible de changer une partie de la structure d'un ADN codant un polypeptide par mutation naturelle ou artificielle sans changement significatif de l'activité du polypeptide. Le polypeptide physiologiquement actif, humain, codé par l'ADN de la présente invention, comprend un polypeptide ayant une structure correspondant à la ou aux variantes homologues du polypeptide ayant la séquence susmentionnée des acides aminés. Tous ces polypeptides physiologiquement actifs seront appelés ci-après «FNT humain».

Selon un autre aspect de la présente invention, on prévoit un acide désoxyribonucléique comprenant une séquence de bases codant un polypeptide physiologiquement actif, humain.

De préférence, l'acide désoxyribonucléique comprend au moins une séquence de bases choisie dans le groupe consistant en une séquence de bases représentée par la formule (II) qui suit et une séquence des bases complémentaires de ladite séquence de bases:

ou artificielle sans provoquer un changement de l'activité principale du polypeptide.

Selon la dégénération du code génétique, il est possible de substituer au moins une base de la séquence de bases d'un gène par une autre sorte de base sans forcer la séquence des acides aminés du polypeptide produit à partir du gène à changer. Par conséquent, l'ADN de la présente invention peut également avoir toute séquence de bases qui a été changée par substitution selon la dégénération du code génétique. Dans ce cas, la séquence des acides aminés déduite de la séquence de bases obtenue par la substitution susmentionnée est identique à la séquence des acides aminés de formule (I), telle que définie précédemment.

Selon un autre aspect de la présente invention, on prévoit un ADN recombinant répliquable qui comprend l'acide désoxyribonu-

cléique susmentionné selon la présente invention et un véhicule d'expression répliquable. L'ADN recombinant est capable, dans une culture de cellules ou de micro-organismes transformée, d'exprimer un polypeptide comprenant la séquence des acides aminés du FNT humain. Comme véhicule approprié, on peut mentionner, par exemple, les véhicules d'expression pHFNT-lacUV5-1 et pHFNT-lacUV-5-2.

Par ailleurs, la présente invention est dirigée vers une culture d'un micro-organisme ou d'une cellule transformée par un ADN recombinant capable d'exprimer un polypeptide comprenant la séquence des acides aminés du FNT humain. Des exemples d'une telle culture de micro-organismes ou de cellules comprend *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, des levures et des cellules animales supérieures. Selon un autre aspect de l'invention, on prévoit un procédé de production du polypeptide physiologiquement actif, humain, de la présente invention qui comprend:

- a) la liaison de l'acide désoxyribonucléique de la formule (II) ci-dessus définie à un véhicule d'expression répliquable pour obtenir un ADN recombinant répliquable comprenant ledit acide désoxyribonucléique et ledit véhicule d'expression répliquable;
- b) la transformation de cellules d'une culture de micro-organismes ou de cellules par ledit ADN recombinant répliquable pour former des transformants;
- c) le choix desdits transformants de cellules parentes de la culture de micro-organismes ou de cellules;
- d) l'incubation desdits transformants, forçant lesdits transformants à exprimer ledit acide désoxyribonucléique et à produire un polypeptide physiologiquement actif, humain, et
- e) l'isolement dudit polypeptide physiologiquement actif, humain, des transformants incubés.

Selon le procédé de la présente invention, l'acide polydésoxyribonucléique ci-dessus décrit de la présente invention est lié à un véhicule d'expression répliquable en tant que vecteur pour obtenir un ADN recombinant répliquable contenant l'acide polydésoxyribonucléique susmentionné. Une culture de micro-organismes ou de cellules est transformée par l'ADN recombinant répliquable ainsi obtenu pour obtenir une culture de micro-organismes ou de cellules transformée contenant l'ADN recombinant. Le transformant ainsi obtenu est isolé de la culture de micro-organismes ou de cellules parente au moyen d'un trait phénotypique imparté avec l'ADN. On fait croître la culture transformée ainsi obtenue de micro-organismes ou de cellules pour effectuer l'expression de l'information génétique qui est codée sur l'acide désoxyribonucléique susmentionné, pour ainsi produire un polypeptide physiologiquement actif selon la présente invention.

Par ailleurs, la présente invention est dirigée vers un FNT humain sous forme mûre, sécrété de cellules hôtes en tant que produit d'expression directe. Comme procédé pour obtenir un tel FNT humain mûr, on peut mentionner par exemple un procédé consistant à construire une séquence d'ADN afin de lier une séquence d'acides aminés connue comme un peptide signal, composée de 15 à 40 acides aminés, qui est dérivée d'un micro-organisme ou d'un animal supérieur au terminus de la séquence d'acides aminés du FNT mûr.

Le FNT humain peut être obtenu comme suit:

1. On a utilisé une génothèque bactériophage λ /lapin et une génothèque bactériophage λ /humain préparées par le professeur T. Maniatis, Département de biochimie et biologie moléculaires, Université de Harvard, 7 Divinity Avenue, Cambridge, Massachusetts 02138, USA. Ces matériaux peuvent être préparés selon les protocoles qui suivent [voir «Cell», 15, p. 687 (1978)]:

- a) des tissus de lapin ou humains, par exemple du tissu de pancréas de lapin ou humain, sont réduits en poudre gelée et traités pour digérer l'ARN et des matériaux de protéine et donnent, à la précipitation, de l'ADN de lapin ou humain de fort poids moléculaire;
- b) l'ADN de fort poids moléculaire est partiellement digéré pour une coupe statistique par rapport au lieu du gène;

c) les fragments résultant d'ADN sont fractionnés pour donner des fragments de 15 à 20 kb paires de bases (kb);

d) les fragments résultant de l'étape c sont clonés en utilisant un vecteur phagique λ Charon 4A, et

e) les vecteurs résultants sont conditionnés *in vitro* en particules phagiques infectieuses contenant ADNr pour obtenir la génothèque de lapin ou humaine susmentionnée.

2. L'ADNc du FNT du lapin que l'on obtient à l'exemple de référence 3 est marqué 32 P par la méthode de translation de P.W.J. Rigby et autres [voir «J. Mol. Biol.» 113, p. 237 (1977)].

3. Chacune des génothèques bactériophage λ /lapin et bactériophage λ /humain est plaquée à une confluence virtuelle sur un tamis de bactéries et l'hybridation est examinée avec l'ADNc du FNT du lapin marqué 32 P.

4. A partir des clones appropriés, l'ADN correspondant est isolé, mis en carte de restriction et analysé par hybridation de Southern [voir E.M. Southern, «J. Mol. Biol.», 98, p. 503 (1975)].

Des fragments de restriction contenant des gènes de FNT de lapin ou humains sont sous-clonés en vecteurs plasmidiques, puis séquencés.

5. La séquence de bases de l'ADNc du FNT du lapin est comparée à celle du gène de FNT du lapin pour déterminer les exons (certaines séquences de bases qui codent la séquence d'acides aminés du FNT du lapin) et introns (certaines séquences de bases qui ne codent pas la séquence d'acides aminés du FNT du lapin) du gène de FNT du lapin.

6. Ensuite, la séquence de bases du gène de FNT humain est comparée à celle du gène de FNT du lapin pour déterminer les exons et les introns du gène de FNT humain.

7. La séquence des acides aminés du FNT du lapin qui a été déduite de la séquence de bases obtenue en laissant les introns du gène de FNT du lapin et en combinant ses exons est affirmée comme étant en accord avec celle déduite de la séquence de bases de l'ADNc du FNT du lapin. Ensuite, la séquence des acides aminés du FNT humain est déduite de la séquence de bases de l'ADN codant le FNT humain obtenue en laissant les introns du gène de FNT humain et en combinant ses exons. La séquence des acides aminés du FNT humain est affirmée comme étant partiellement en accord avec celle du FNT du lapin.

8. Alors, l'ADN codant le FNT humain est déterminé *in vitro* pour insertion dans un véhicule d'expression approprié pour reformer l'ADN recombinant contenant l'ADN de codage. L'ADN recombinant est utilisé pour transformer une cellule hôte appropriée qu'à son tour on laisse croître dans une culture et pour exprimer le FNT humain souhaité.

9. Le FNT humain ainsi produit a 155 résidus d'acide aminé sous sa forme mûre, commençant par la sérine. Lorsqu'il a un signal peptide dans sa préséquence, le signal peptide est de caractère très hydrophobe.

Ce qui précède révèle les processus pour obtenir le gène de FNT humain, la séquence de bases de l'ADN codant le FNT humain et le procédé de production de FNT humain en utilisant l'ADN. Cependant, on comprendra que ce qui précède n'est pas destiné à limiter l'invention et que des changements évidents peuvent être apportés par ceux qui sont compétents en la matière sans changer les caractéristiques essentielles et le concept de base de l'invention.

Du fait de la fréquence variable d'utilisation d'un codon (code génétique) correspondant à chaque acide aminé et pour d'autres raisons, une partie partielle ou totale de la séquence de bases de l'ADN codant le FNT humain peut être substituée par un ADN artificiel organique, chimiquement synthétisé, sans forcer à changer la séquence des acides aminés du polypeptide qui en est obtenu.

On suppose que le FNT humain peut être procédé intracellulairement sous forme immature en tant que prépeptide ou prépropeptide que l'on peut faire croître par une forme intermédiaire en un FNT mûr au stade de traitement. La forme immature du FNT humain peut être déduite de la séquence de bases du gène de FNT humain. L'ADN du FNT comprenant un ADN codant le FNT sous

forme immature ou intermédiaire peut également être recombiné à un ADN naturel ou artificiellement synthétisé.

Une application de cette technique peut être atteinte en insérant le codon méthionine (ATG) dans l'extrémité 5' et en insérant au moins un codon d'arrêt choisi parmi TAA, TAG et TGA à l'extrémité 3' de l'ADN du FNT mûr ou intermédiaire ou immature. Du fait de la présence du codon de méthionine, le FNT mûr ou intermédiaire ou immature peut être produit sur l'ARNm synthétisé à l'aide d'un promoteur approprié. Cependant, le résidu de méthionine attaché au terminus N du FNT est scindé ou non scindé selon la sorte de cellule hôte employée. L'insertion du codon d'arrêt a pour but d'arrêter la translation de l'ARNm transcrit de l'ADN du FNT en une position appropriée [terminus C du polypeptide de formule (I)].

Une autre application de cette technique peut être atteinte en ajoutant, à l'ADN, une séquence de bases très hydrophobe, connue par «séquence du signal». Par cette addition, il peut devenir possible de sécréter le FNT vers l'extérieur de la cellule hôte ou, dans le cas d'une bactérie Gram négatif, dans l'espace connu par «périplasm».

Lorsqu'un vecteur où un codon de départ est incorporé est employé, un peptide fondu peut être produit qui comprend le FNT humain et un peptide attribué au vecteur. Dans ce cas, le peptide fondu peut être scindé chimiquement ou enzymatiquement. Alternativement, le peptide fondu, si l'activité principale du FNT humain n'est pas affectée de manière néfaste, peut être utilisé tel qu'il est.

L'ADN du FNT humain peut être connecté, à sa région en amont de l'extrémité 5', à la séquence génétique d'un promoteur pour ainsi obtenir une séquence promoteur-ADN du FNT qui ne gêne pas sa réplication et n'affecte pas de manière néfaste la translation de l'ARN résultant. La séquence promoteur-ADN du FNT ainsi obtenue peut être combinée à un vecteur qui est répliquable dans une bactérie ou une cellule d'organisme supérieur pour obtenir un gène recombinant. Le gène recombinant ainsi obtenu peut être utilisé pour transformer une bactérie ou une cellule d'organisme supérieur utilisée comme hôte. Le transformant ainsi obtenu peut être mis en culture pour effectuer l'expression du gène de FNT afin de produire le FNT humain.

Lorsque l'on utilise *E. coli* comme hôte susmentionné, on peut mentionner, comme hôte approprié, diverses souches mutantes d'*E. coli* K-12 comme HB101 (ATCC33694), C600K (ATCC33955), D1210, RRI (ATCC31343), MC1061, LE392 (ATCC33572), JM101 (ATCC33876), JM83 et κ 1776 (ATCC31244). Lorsque l'on emploie *E. coli* comme hôte, on peut mentionner, comme vecteur approprié, des plasmides comme pBR322, pBR325, pBR327, pUC8, pUC9, pMB9 (ATCC37019), pJB8 (ATCC37074) et pKC7 (ATCC37084), des λ phages comme λ gt, λ B et Charon 4A, et M13 phage. Pour que le FNT soit produit dans la cellule d'*E. coli*, un promoteur choisi parmi les promoteurs des gènes d'*E. coli* et phagiques peut être employé. Des exemples d'un promoteur approprié comprennent les gènes pour l'enzyme de la dégradation du lactose (LAC), son mutant UV5, la pénicillinase (BLA) et la tryptophane synthétase (TRP), le promoteur de λ phage P_L et le promoteur *tac* qui est un promoteur fondu de tryptophane synthétase et de l'enzyme de dégradation du lactose.

Lorsque l'on utilise *Bacillus subtilis* comme hôte, on peut mentionner, comme hôte approprié, la souche BD170 (ATCC33608), la souche BR151 (ATCC33677) et la souche M112 (ATCC33712). Lorsque l'on emploie *Bacillus subtilis* comme hôte, on peut mentionner, comme vecteur approprié, les plasmides pC194 (ATCC37034), pUB110 (ATCC37015), pSA2100 (ATCC37014) et pE194. Par ailleurs, lorsque l'on emploie *Bacillus subtilis* comme hôte, on peut mentionner, comme promoteur approprié, les gènes pour l'enzyme de l'acétylation du chloramphénicol (CAT), la pénicillinase et l'antiérythromycine.

Lorsqu'une levure est utilisée comme hôte, on peut mentionner, comme hôte approprié, des souches de *Saccharomyces cerevisiae* comme RH218 (ATCC44076), SHY1 (ATCC44769), SHY3 (ATCC44771), D131A, 483 et 830. Lorsque la levure hôte est em-

ployée, on peut mentionner, comme vecteur approprié, des plasmides comme YEp13 (ATCC37115), YEp6, YRp7 et YIp5. Par ailleurs, lorsque la levure hôte est employée, on peut mentionner, comme promoteur approprié, les gènes pour la phosphatase acide, l'alcool déshydrogénase (ADHI), la tryptophane synthétase (TRP), la phosphoglycérate kinase (PGK), le cytochrome B (COB) et l'actine.

Lorsqu'une culture de cellules d'un organisme supérieur est utilisée pour l'hôte, on peut mentionner, comme hôte approprié, les cultures de cellules du rein du singe, COS et la souris C127 (ATCC1616). Lorsque l'hôte d'une culture de cellules d'un organisme supérieur est employé, on peut mentionner, comme vecteur approprié, le virus SV40 et le virus du polyome du bovin.

Le nouveau polypeptide physiologiquement actif, humain, induit la nécrose des tumeurs sans effet toxique sur les tissus normaux du corps vivant. Le polypeptide actif peut être formulé selon des méthodes connues pour préparer des compositions pharmaceutiques qui sont utiles pour l'inhibition de la prolifération des cellules, comme la prolifération des cellules de tumeur maligne. Le polypeptide actif peut être combiné en mélange avec un véhicule de support acceptable en pharmacie. Une quantité efficace du polypeptide actif de la présente invention peut être mélangée à une quantité appropriée d'un véhicule, afin de préparer des compositions pharmaceutiquement acceptables, appropriées à une administration effective au destinataire.

Le polypeptide physiologiquement actif peut être administré à des sujets nécessitant un traitement antitumoral ou antiviral, sous la forme d'une injection, de gouttes oculaires, de gouttes nasales, d'un agent d'inhalation, d'une préparation externe, d'une administration orale, d'une administration rectale ou d'un comprimé vaginal. La dose quotidienne du polypeptide de la présente invention par adulte peut généralement être comprise entre 50 et 100 000 000 d'unités. Elle peut être préférable entre 50 et 500 000 unités dans le cas d'une administration locale, entre 1000 et 1 000 000 d'unités dans le cas d'une injection générale comme une injection intraveineuse et une injection intramusculaire, et entre 10 000 et 100 000 000 d'unités dans le cas d'une administration orale. La dose quotidienne peut être accrue ou diminuée selon la direction d'utilisation et les symptômes du destinataire.

La terminologie «unité» utilisée ci-dessus signifie une quantité du polypeptide physiologiquement actif de la présente invention, par laquelle 50% de 1×10^5 cellules/ml de cellules L-M (American Type Culture Collection CCL1,2) sont tuées. La quantité susmentionnée est mesurée comme suit. Comme récipients de culture, on emploie des plaques de microtitrage à 96 puits, produites par Flow Laboratories, Inc. (USA), et des cellules L-M sont mises en culture dans un milieu essentiel minimum d'Eagle contenant 1 v/v% de sérum fœtal bovin. [La composition de ce milieu est décrite par exemple dans «Tissue Culture», édité par Junnosuke Nakai et autres, Asakura Shoten, Japon (1967).] Un échantillon (0,1 ml) dilué en série avec le milieu et la suspension de cellules L-M (0,1 ml, 1×10^5 cellules/ml) sont mélangés dans chaque puits des plaques et les plaques sont incubées à 37° C pendant 48 heures dans de l'air contenant 5% de gaz carbonique. A la fin de la période de culture, on ajoute 20 μ l de glutaraldéhyde pour fixer les cellules. Après fixation, les plaques sont lavées avec de l'eau distillée et on les laisse sécher, et l'on ajoute 0,05% de bleu de méthylène (0,1 ml) pour teinter les cellules viables. Les plaques sont totalement lavées avec de l'eau distillée pour retirer le colorant en excès et on les laisse sécher. On ajoute de l'acide chlorhydrique 0,36N à chaque puits pour extraire le colorant des cellules teintées. L'absorbance de chaque puits à 665 nm est mesurée avec Titertek Multiskan produit par Flow Laboratories, Inc. L'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules viables. La quantité susmentionnée du polypeptide physiologiquement actif de la présente invention, par laquelle 50% de 1×10^5 cellules/ml de L-M sont tuées, est obtenue en représentant la dilution en fonction de l'absorbance sur un graphique.

Le polypeptide physiologiquement actif peut être avantageusement administré par voie parentérale. Dans la préparation parentérale, on peut incorporer, comme additif, un agent épaississant comme du saccharose, de la glycérine, de la méthylcellulose, de la carboxyméthylcellulose ou analogue et/ou un agent d'ajustement du pH comme divers sels inorganiques. Le polypeptide peut également être administré de manière appropriée sous la forme d'un comprimé. Dans le comprimé, on peut incorporer, comme additif, un véhicule comme de l'amidon, du lactose ou analogue.

Par suite d'expériences sur animaux, on a trouvé qu'une tumeur de souris était totalement guérie par une ou deux injections seulement, dans la plupart des cas. En particulier, une portion des cellules néoplastiques artificielles (cellules Meth-A) a été transplantée sur la peau de chaque souris. Lorsque la tumeur a crû pour avoir un diamètre de 6 à 7 mm, on a injecté une quantité aussi faible que 0,6 µg du polypeptide de la présente invention. Une semaine plus tard, il est apparu une croûte. Deux semaines plus tard, des poils ont commencé à pousser, ce qui signifie une guérison complète de la tumeur. Ultérieurement, une gestation et une naissance réussies sont observées pour les souris.

La présente invention sera décrite plus en détail en se référant aux exemples de référence et aux exemples d'utilisation suivants, qui ne doivent pas être considérés comme limitant le cadre de la présente invention.

Dans la mise en pratique de la présente invention, la construction d'un ADN recombinant et l'insertion d'un ADN recombinant à un micro-organisme ont été effectuées selon le processus décrit dans les rapports expérimentaux qui suivent (littérature N^{os} 1 à 4), à moins que cela ne soit indiqué autrement.

1. Yasutaka Takagi, «Manual for Genetic Engineering», Kodan-sha, Tokyo.

2. Yasutaka Takagi, «Experimental Method in Genetic Engineering», Kodan-sha, Tokyo.

3. T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sam Brook, «Molecular Cloning», Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

4. Ray Wu et autres, «Method in Enzymology», vol. 101, Academic Press, New York.

Abréviations utilisées dans les exemples de référence et les exemples :

MOPS: acide morpholinopropanesulfonique

milieu LB: milieu de Luria-Bertani

DMSO: diméthylsulfoxyde

PFU: unité formant une plaque

EDTA: acide éthylènediaminotétracétique

SDS: dodécylsulfate de sodium

BRL: Bethesda Research Laboratories

DMT: diméthoxytrityle

lac: lactose

tris: tris(hydroxyméthyl)aminométhane

XAR-5: film aux rayons X fabriqué et vendu par Eastman Kodak Company, USA

1 × SCC: 0,15M NaCl + 0,015M citrate de sodium, pH 7

2 × SSC: 0,30M NaCl + 0,030M citrate de sodium, pH 7

3 × SSC: 0,45M NaCl + 0,045M citrate de sodium, pH 7

5 × SSC: 0,75M NaCl + 0,075M citrate de sodium, pH 7

6 × SSC: 0,9M NaCl + 0,09M citrate de sodium, pH 7

FDSS: 50% de formamide désionisé + 5 × Denhardt + 5 × SSPE + 0,1% SDS + 100 µg/ml d'ADN de thymus de veau dénaturé (SSPE: 0,18M NaCl + 10mM NaH₂PO₄ + 1mM EDTA, pH 7,4)

SM: milieu de stockage de phages qui contient 5,8 g de NaCl, 2 g de MgSO₄ · 7H₂O, 50 ml de 1M tris · Cl (pH 7,5) et 5 ml de 2% de gélatine par litre

bouillon NZ: milieu qui contient 10 g d'amine NZ, 5 g de NaCl et 2 g de MgSO₄ · 7H₂O (l'amine NZ est un hydrolysate du type A de caséine fabriqué et vendu par Humko Sheffield Chemical Division de Kraft, Inc., USA)

IPTG: isopropylthiogalactoside

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolylgalactoside

TAE: 0,04M trisacétate (pH 8,0) - 0,002M EDTA

solution de 5 × Denhardt: une solution aqueuse contenant Ficoll

1000 mg, polyvinylpyrrolidone 1000 mg et BSA 1000 mg par litre

bp: paire de bases

Exemple référentiel 1: Evaluation de l'activité cytotoxique contre les cellules L

L'évaluation de l'activité cytotoxique de la substance physiologiquement active préparée dans les exemples référentiels et exemples qui suivent contre les cellules L est effectuée en mesurant son effet cytotoxique sur les cellules L929 (American Type Culture Collection CCL1), selon la méthode de Ruff et autres [voir «Lymphokines», vol. 2, édité par E. Pick, Academic Press, New York, p. 235 (1980)] ou la méthode décrite dans «J. Immunology», 126, p. 1279 (1981). La méthode d'évaluation de l'activité cytotoxique de la substance physiologiquement active préparée dans les exemples sera expliquée ci-après.

Comme récipients de culture, on emploie des plaques de microtitrage à 96 puits, produites par Flow Laboratories, Inc. (USA), et des cellules L929 sont mises en culture dans le milieu essentiel minimum d'Eagle contenant 1v/v% de sérum de veau fœtal et 5 µg/ml (concentration finale) d'actinomycine D. [La composition de ce milieu est décrite par exemple dans «Tissue Culture», édité par Junnosuke Nakai et autres, Asakura Shoten, Japon (1967).] Un échantillon (0,1 ml) dilué en série avec le milieu et la suspension de cellules L929 (0,1 ml, 1 × 10⁵ cellules) sont mélangés dans chaque puits des plaques et les plaques sont incubées à 37° C pendant 21 heures dans de l'air contenant 5% de gaz carbonique. A la fin de la durée de culture, on ajoute 20 µl d'une solution aqueuse à 20% de glutaraldéhyde pour fixer les cellules. Après fixation, les plaques sont lavées avec de l'eau distillée et on les laisse sécher, et on ajoute 0,05% de bleu de méthylène (0,1 ml) pour colorer les cellules viables. Les plaques sont totalement lavées avec de l'eau distillée pour retirer le colorant en excès et on les laisse sécher. On ajoute 0,36N d'acide chlorhydrique à chaque puits pour extraire le colorant des cellules teintées. L'absorbance de chaque puits à 665 nm est mesurée avec Titertek Multiskan produit par Flow Laboratories, Inc., USA. L'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules viables. L'activité cytotoxique de la substance physiologiquement active, unité/ml, est définie comme la dilution réciproque de la substance physiologiquement active qui provoque 50% de cytotoxicité, et on peut l'obtenir en représentant la dilution en fonction de l'absorbance sur un graphique. L'«unité» utilisée dans les exemples référentiels signifie une quantité de FNT du lapin, par laquelle 50% de 10⁵ cellules/ml de cellules L929 sont tuées.

Par ailleurs, la quantité de protéine est déterminée par une méthode dans laquelle du bleu brillant de Coomassie G250 est lié à la protéine, selon l'enseignement de Bradford et autres [voir «Anal. Biochem.», vol. 72, pp. 248-254 (1976)].

Exemple référentiel 2

Etape 1: Préparation du FNT du sérum du lapin

40 lapins femelles, pesant 2,5 à 3 kg, reçoivent une injection de 50 mg de *Propionibacterium acnes* tué à la formaline (*Corynebacterium parvum*, Wellcome Research Laboratories, GB) par la veine auriculaire. Huit jours plus tard, on injecte de nouveau 100 µg d'endotoxine (lipopolysaccharide d'*E. coli* 026:B6, produit par Difco Laboratories, USA) à travers la veine auriculaire et, 2 heures après, le sang entier est recueilli du cœur. Au sang recueilli, on ajoute de l'héparine sodium en une quantité de 100 unités pour 100 ml. Le sang est alors centrifugé tout en le refroidissant à 5000 tr/min pendant 30 minutes pour retirer les cellules du sang et les solides insolubles. Par suite, on obtient des 40 lapins un plasma (2,4 l) ayant une activité cytotoxique du FNT du sérum de 3 × 10⁴ unités/ml.

Etape 2: Purification partielle du FNT du sérum du lapin

Au plasma (2,4 l) obtenu à l'étape 1, on ajoute 24 g de cellule. Le résultat est agité pendant 1 heure, puis est soumis à une filtration. Le filtrat est mélangé à 1,2 l de 0,04M de tampon tris-HCl (pH 7,8), puis est appliqué à une colonne de DEAE-Sepharose CL-6B (fabriqué et vendu par Pharmacia Fine Chemical, Inc., Suède), suffisamment équilibrée avec 0,04M de tampon tris-HCl (pH 7,8). La colonne est lavée avec 0,04M de tampon tris-HCl contenant 0,1M de NaCl, et le FNT adsorbé est élué avec 0,04M de tampon tris-HCl (pH 7,2) contenant 0,18M de NaCl. Les fractions présentant des activités cytotoxiques contre les cellules L sont concentrées par ultrafiltration. Le concentré ainsi obtenu est appliqué à une colonne de Sephacryl S-200 (fabriqué et vendu par Pharmacia Fine Chemicals, Inc. Suède), suffisamment équilibrée avec 5M de tampons de phosphate, et filtré sur gel en utilisant le même tampon. Les fractions actives sont concentrées par ultrafiltration, et on obtient ainsi un FNT purifié ayant une activité de $3,5 \times 10^6$ unités et une activité spécifique de 18×10^3 unités/mg.

Etape 3: Anticorps anti-FNT

Le FNT du sérum du lapin partiellement purifié à l'étape 2 est mélangé à l'adjuvant complet de Freund (1:1), puis est injecté par voie sous-cutanée au dos d'une souris mâle BALB/c de 12 semaines. L'opération ci-dessus est répétée 2 et 4 semaines après l'injection initiale. Une semaine après la dernière injection, le sang entier est recueilli. Du sang recueilli, un sérum est obtenu.

Le sérum ainsi obtenu est ajouté au milieu de culture pour évaluation de l'activité cytotoxique du FNT contre les cellules L en une quantité telle qu'il soit dilué 500 fois à la concentration finale. L'activité cytotoxique du FNT du sérum du lapin contre les cellules L est évaluée de la même façon qu'on l'a décrit à l'exemple référentiel 1. On trouve que le FNT du sérum du lapin ne présente aucune cytotoxicité contre les cellules L. Par le résultat ci-dessus, on peut en conclure que le sérum de la souris obtenu dans cette étape contient un anticorps du FNT du sérum du lapin (que l'on appellera ci-après «anticorps anti-FNT»).

Exemple référentiel 3

Etape 1: Préparation de cellules produisant le FNT

Un lapin femelle reçoit une injection intraveineuse de cellules tuées à la formaline de *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium parvum*, Wellcome Research Laboratories, GB). Sept jours plus tard, le lapin est soumis à une trachéotomie, et le poumon est lavé avec une solution saline physiologique, et on obtient ainsi des cellules flottantes. Les cellules ainsi obtenues sont lavées avec une solution saline physiologique. En utilisant, comme milieu de culture, RPMI 1640 (Flow Laboratories, Inc., USA) contenant 10 v/v% de sérum fœtal de veau, les cellules sont incubées à 37°C dans de l'air contenant 5% de gaz carbonique. La culture de cellules est divisée en deux groupes et, à l'un d'entre eux, on ajoute, à une concentration de 10 g/ml, l'endotoxine dérivée d'*E. coli* (lipopolysaccharide d'*E. coli* 026:B6, produit par Difco Laboratories, USA). La même quantité d'eau stérile est ajoutée à l'autre. Le liquide surnageant de la culture de cellules où l'endotoxine est ajoutée présente une activité cytotoxique contre les cellules L, et l'activité atteint la valeur maximum en 7 heures. Cette activité est dissipée par l'anticorps anti-FNT, mais n'est pas dissipée par le sérum normal de souris.

Par ailleurs, le liquide surnageant de la culture de cellules où aucune endotoxine n'est ajoutée ne présente pas de cytotoxicité contre les cellules L.

Etape 2: Poids moléculaire du FNT

A la culture de cellules préparée à l'étape 1 où l'on a ajouté l'endotoxine, on ajoute encore de la L-[³⁵S]méthionine radioactive (1300 Ci/mmol, produite par Amersham Industries plc, GB (1 mCi/ml). Selon la méthode de Laemmli [voir Laemmli, U.K. (1970), «Nature» (Londres), vol. 227, pp. 680-685], le liquide surnageant est

analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. La concentration du gel est ajustée à 12,5% en poids. Après l'électrophorèse, le gel est traité avec ENHANCE[®] (dénomination commerciale d'un produit de New England Nuclear, Inc., USA) et, après séchage, il est exposé à un film aux rayons X (Fuji RX, fabriqué et vendu par Fuji Photo Film Co., Ltd, Japon). Dans le liquide surnageant de la culture de cellules en présence d'endotoxine, on observe qu'une substance ayant un poids moléculaire d'environ 17 500 se forme.

Par ailleurs, le liquide surnageant de chaque culture de cellules préparée à l'étape 1 est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS de la même façon qu'on l'a décrit ci-dessus. Ensuite, on agite le gel dans 2,5% de NP 40[®] (agent tensio-actif vendu par Calbiochem, USA) pendant 1 heure, puis dans l'eau pendant 2 heures. Après agitation, chaque voie de migration est séparée en coupant, et on coupe en bandes de 2 mm de large dans une direction perpendiculaire à la direction de migration. Chaque bande est mise en culture avec des cellules L, et on évalue l'activité cytotoxique contre les cellules L. Dans la voie sur laquelle le liquide surnageant de la culture de cellules contenant l'endotoxine se déve-

loppe, la cytotoxicité contre les cellules L est observée en une position correspondant au poids moléculaire de 17 500. Aucune cytotoxicité n'est observée aux autres positions.

Etape 3: Extraction d'ARNm

La culture de cellules préparée à l'étape 1 est incubée pendant 2 heures après addition d'endotoxine, avec ensuite centrifugation pour recueillir les cellules. L'extraction de l'ARN cytoplasmique des cellules recueillies et l'extraction d'ARNm de l'ARN cytoplasmique sont effectuées selon la méthode de Chirgwin et autres [voir Chirgwin, J.M., et autres, «Biochemistry», vol. 18, p. 5294 (1979)]. On ajoute 4 ml d'une solution 4M de thiocyanate de guanidine à 3×10^8 cellules, et le mélange est pulvérisé au moyen d'un homogénéiseur (modèle: AM-7, fabriqué et vendu par Nihon Seiki Seisakusho, Japon). Les résidus sont retirés par centrifugation et on y dissout 2,4 g de chlorure de césium. Le mélange est versé avec soin dans un tube en polyallomère où l'on avait introduit à l'avance 2,5 ml d'une solution 5,7M de chlorure de césium et 0,1M d'EDTA (pH 7,5) et, ensuite, on soumet à une ultracentrifugation à 30 000 tr/min pendant 12 heures à 20°C en utilisant un rotor Beckman SW41 (fabriqué et vendu par Beckman Instrument, USA). Après enlèvement du liquide surnageant, la boulette est dissoute dans 1 ml d'un tampon tris-HCl 10mM (contenant 5mM d'EDTA et 1 poids/volume % de SDS). La solution résultante est extraite avec un mélange à 4:1 en volume de chloroforme et de 1-butanol. Dans la phase aqueuse, on ajoute 0,05 volume d'acétate de sodium 2M et 2,5 volumes d'éthanol, et on laisse au repos à -20°C pendant 2 heures ou plus pour ainsi précipiter l'ARN. Le précipité est recueilli par centrifugation, séché, puis dissous dans 500 µl d'eau stérile. Par suite, on obtient une solution d'ARN cytoplasmique.

La solution d'ARN ci-dessus obtenue est chauffée à 68°C pendant 2 minutes, puis est rapidement refroidie. On ajoute, dans la solution, 500 µl d'une concentration à 2 fois d'un tampon tris-EDTA 10mM (pH 7,4) (contenant 1mM d'EDTA, 0,1 poids/volume % de SDS et 0,5M de chlorure de lithium), et le mélange est appliqué à une colonne de 200 mg d'oligo dT-cellulose (fabriquée et vendue par BRL, Inc., USA) et lavé avec 10 ml du même tampon (concentration une fois) que ci-dessus décrit. Le matériau retenu par la colonne est élué avec 2 ml d'un tampon d'éluion contenant 10mM d'un tampon tris-HCl, pH 7,4, 1mM d'EDTA et 0,1 poids/volume % SDS. A l'éluat, on ajoute 0,05 volume d'une solution d'acétate de sodium et 2,5 volumes d'éthanol, et on refroidit le mélange à -20°C pour précipiter. Le précipité est recueilli par filtration et appliqué à la colonne d'oligo dT-cellulose, et les fractions adsorbées sur l'oligo dT-cellulose sont recueillies. On récupère 85 g d'ARNm en déterminant par analyse du spectre ultraviolet.

Etape 4: Fractionnement d'ARNm

On dissout 880 µg d'ARNm, préparé selon la même méthode

qu'à l'étape 3, dans 250 µl d'eau, et la solution résultante est disposée en couches sur un gradient de densité linéaire de saccharose de 10 ml à 5-25%. Le gradient de densité de saccharose est préparé au moyen de l'appareil ISCO 570 (fabriqué et vendu par ISCO Inc., USA) en utilisant des solutions de tampons tris [contenant 25mM de tris-HCl (pH 7,2), 2mM d'EDTA et 1 poids/volume % de SDS], respectivement contenant 5% de saccharose et 25% de saccharose.

En utilisant un rotor Beckman SW41, une ultracentrifugation est effectuée à 40 000 tr/min pendant 12 heures à 4° C, et des fractions, chacune de 400 µl, sont récupérées par un dispositif de récupération de fractions (fabriqué et vendu par Beckman Instrument, USA), puis précipitées dans l'éthanol. Les fractions précipitées sont centrifugées et dissoutes dans l'eau stérile.

Etape 5: Expérience sur la translation d'ARNm

La translation d'ARNm en utilisant des oocytes de *Xenopus laevis* (matériau d'enseignement biologique de Hamamatsu) est entreprise selon le processus décrit dans les rapports expérimentaux (par exemple Hiroshi Teraoka, Mikio Itsuki et Kentaro Tanaka, «Protein, Nucleic Acid, Enzyme», Genetic Engineering, édition spéciale, 1981, p. 602). *Xenopus laevis* provient des matériaux d'enseignement biologique de Hamamatsu. L'ARNm fractionné obtenu à l'étape 4 est dissous dans l'eau stérile pour avoir une concentration de 1 µg/µl, et la solution est injectée à des oocytes en une quantité aussi faible que 50 nl par cellule. Les cellules sont alors mises en culture pendant 24 heures dans une solution de Barth [contenant 7,5mM de tris-HCl (pH 7,6), 88mM de NaCl, 1mM de chlorure de potassium, 0,33mM de nitrate de calcium, 0,41mM de chlorure de calcium, 0,82mM de sulfate de magnésium, 2,4mM de bicarbonate de soude, 18 U/ml de pénicilline G et 18 µg/ml de streptomycine] qui contient 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin. Les oocytes sont écrasés, dans le liquide de culture, au moyen d'une barre en verre. Le liquide de culture est alors centrifugé et le liquide surnageant est évalué pour l'activité cytotoxique contre les cellules L. L'ARNm, qui sera translaté pour donner un polypeptide ayant une activité maximum, se sédimente sous forme de 16 S en dimension. Cette activité est éliminée par l'anticorps anti-FNT obtenu à l'étape 3 de l'exemple référentiel 2, mais n'est pas éliminée par le sérum normal de la souris.

Etape 6: Préparation des transformants

En utilisant 5 µg d'ARNm fractionné obtenu à l'étape 4, on prépare un ADN à deux brins selon le processus décrit dans la littérature N° 1, à partir de la page 96. Pour la transcriptase inverse, on utilise un produit de Life Science, Inc., USA. L'ADN à deux brins est fractionné sur un gel de polyacrylamide à 3,5% et on obtient des fractions de 330 ng d'environ 1000 à 2000 bp. Selon le processus décrit dans la littérature N° 1, on étend 7 ng de cette fraction avec des résidus désoxyC en utilisant la désoxynucléotidyl transférase terminale (fabriquée et vendue par BRL, Inc., USA), et on recuit avec 56 ng de plasmide pBR322 ayant été digéré avec *Pst*I et étendu avec les résidus de désoxyG. Le mélange ainsi recuit est inséré dans la souche *E. coli* K-12 (HB101, ATCC33694) pour transformer la souche. Par suite, on obtient 12 000 transformants.

Etape 7: Séquence d'acides aminés partiels du FNT du lapin

Du FNT du lapin partiellement purifié à l'exemple référentiel 2 (activité: 5×10^7 unités) est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS pour une purification comme à l'étape 2. Une partie du gel est teintée avec le bleu brillant de Coomassie. Une bande à la position correspondant au poids moléculaire de 17 000 est découpée du gel et est extraite avec 1% de bicarbonate d'ammonium. On récupère, sous forme de protéine, environ 180 µg de FNT.

On dissout 150 µg du FNT récupéré dans 75 µl de 1% de bicarbonate d'ammonium, avec ensuite addition de 3 µg de trypsine TPCK (fabriquée et vendue par Worthington Biochemical, USA). Le mélange est incubé à 37° C pendant 4 heures. Le mélange est alors fractionné au moyen d'une colonne de chromatographie

liquide très rapide comprenant Cosmosil 5C8 (fabriqué et vendu par Nakarai Chemical Ltd, Japon) en tant que matériau de garniture, pour ainsi obtenir les fragments digérés avec la trypsine.

Le FNT très purifié et ses fragments digérés à la trypsine sont alors soumis à un dessalage au moyen d'une colonne de Sephadex G-25, puis lyophilisés. Selon la méthode de R.M. Hewick et autres [voir «J. Biol. Chem.», vol. 256, pp. 7990-7997 (1981)], le FNT purifié et les fragments digérés à la trypsine sont soumis à une dégradation d'Edman à partir du terminal N. L'acide aminé-PTH libéré à chaque étape est analysé par la méthode habituelle au moyen d'une chromatographie très rapide, modèle SP8100 (fabriqué et vendu par Spectra Physics, USA), en utilisant Solpacks ODS (fabriqué et vendu par E.I. Du Pont, USA) comme colonne. Par suite, on trouve que le FNT a la séquence d'acides aminés suivante au terminal N:
15 Ser Ala Ser Arg Ala Leu Ser Asp Lys Pro Leu Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Val Glu Gly Gln Leu Gln.

L'un des fragments digérés à la trypsine a la séquence N terminale d'acides aminés qui suit: Glu Thr Pro Glu Glu Ala Glu Pro Met Ala.

Etape 8: Synthèse d'échantillon d'oligodésoxynucléotide

Des oligodésoxynucléotides complémentaires de la séquence des bases d'ARNm que l'on déduit de la séquence des acides aminés du FNT du lapin obtenue à l'étape 7 de l'exemple référentiel 3 sont synthétisés selon la méthode perfectionnée du phosphotriester qui a déjà été rapportée par le présent inventeur dans H. Ito et autres, «Nucleic Acid Res.», 10, 1755-1769 (1982). Pour préparer les oligodésoxynucléotides, 128 oligodésoxynucléotides estimés à partir de la séquence des acides aminés du FNT du lapin sont répartis en cinq groupes, c'est-à-dire des groupes de 16, 16, 32, 32 et 32, et sont synthétisés sous forme de mélanges d'oligodésoxynucléotides des groupes respectifs. Les oligodésoxynucléotides obtenus des groupes respectifs sont déprotégés selon la méthode habituelle et purifiés par chromatographie en colonne en utilisant Sephadex G-50 (fabriqué et vendu par Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Suède), par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 20% en poids contenant 7M d'urée et par chromatographie en colonne en utilisant DE52 (fabriqué et vendu par Whatman Ltd, USA). Les oligodésoxynucléotides des groupes respectifs ainsi obtenus sont dialysés par rapport à une solution tampon 0,1mM de tris-EDTA.

Chacun des oligodésoxynucléotides purifiés des groupes respectifs est marqué en utilisant la polynucléotide kinase T₄ (fabriquée et vendue par BRL, Inc., USA) et le γ^{32} -P-Adénosine triphosphate selon la méthode habituelle et, ensuite, on purifie par chromatographie en colonne en utilisant DE52 (fabriqué et vendu par Whatman Ltd, USA). La matière radioactive est incorporée dans chacun des oligodésoxynucléotides des groupes respectifs en une quantité d'environ 3×10^8 cpm/µg. Les oligodésoxynucléotides échantillons obtenus sous la forme d'un mélange du groupe respectif sont désignés comme cela est montré au tableau 1.

Une partie de la séquence des aminoacides du FNT du lapin, de la séquence des bases d'ARNm estimée à partir de la séquence des aminoacides du FNT du lapin, et des séquences des bases des oligodésoxynucléotides synthétiques échantillons des groupes respectifs sont montrées au tableau 1.

(Tableau en tête de la page suivante)

L'ARNm des cellules produisant le FNT que l'on obtient selon l'étape 3 de l'exemple référentiel 3 est traité avec une solution contenant 1M de glyoxal, 10mM de NaH₂PO₄ et 50% en volume de diméthylsulfoxyde à 50° C pendant 60 minutes, puis est soumis à un fractionnement en utilisant une électrophorèse sur un gel agarose à 1/1% en poids. L'ARNm fractionné est transféré sur un filtre d'un dispositif de transfert du type électrophorèse (fabriqué et vendu par Bio Rad, USA) selon le manuel du fabricant. Alors, l'ARNm sur le filtre du dispositif est traité avec une solution de $5 \times$ Denhardt contenant une solution de $5 \times$ SSC et 150 µg/ml d'ADN de spermatozoïdes de saumon dénaturé à 65° C pendant 2 heures et, ensuite, on

Tableau 1

Séquence d'acides aminés	Carboxyle terminal ... Ala Met Pro Glu Ala Glu Glu ... Amino terminal
ARNm	3' ... XCG GTA XCC YAG XCG YAG YAG ... 5'
MH échantillon	5' GC CAT MGG MTC GGC MTC MTC 3'
MI échantillon	5' GC CAT NGG MTC GGC MTC MTC 3'
MJ échantillon	5' GC CAT ZGG MTC AGC MTC MTC 3'
MK échantillon	5' GC CAT ZGG MTC CGC MTC MTC 3'
ML échantillon	5' GC CAT ZGG MTC TGC MTC MTC 3'

Notes:

X représente un résidu d'acide ribonucléique de A, C, G ou U.

Y représente un résidu d'acide ribonucléique de A ou G.

M représente un résidu d'acide désoxyribonucléique de T ou C.

N représente un résidu d'acide désoxyribonucléique de A ou G.

Z représente un résidu d'acide désoxyribonucléique de A, C, G ou T.

traite avec une solution de $5 \times$ Denhardt contenant 1×10^7 cpm/ml des oligodésoxynucléotides marqués et une solution de $5 \times$ SSC à 50°C pendant 2 heures. Le filtre obtenu ci-dessus est lavé avec une solution de $6 \times$ SSC en succession quatre fois, à la température ambiante, à 40°C , à 50°C et à 60°C . Un film aux rayons X XAR-5 (fabriqué et vendu par Eastman Kodak Company, USA) est exposé au rayonnement du filtre. Par suite, on trouve que les oligodésoxynucléotides désignés par MJ échantillon sont plus fortement hybridés avec l'ARNm, montrant que l'oligodésoxynucléotide ayant une séquence de bases qui est totalement complémentaire d'ARNm est contenu dans les oligodésoxynucléotides désignés par MJ échantillon.

Etape 9: Clonage du gène de FNT du lapin

Selon le processus décrit dans la littérature N° 2, p. 162, les transformants obtenus à l'étape 6 de l'exemple référentiel 3 sont transférés à un filtre de cellulose, et l'ADN des transformants est hybridé avec l'oligodésoxynucléotide marqué (MJ échantillon), choisi à l'étape 8 de l'exemple référentiel 3 dans les mêmes conditions qu'à l'étape 8 de l'exemple référentiel 3 (hybridation des colonies). Dans le processus ci-dessus, 49 colonies, qui sont fortement hybridées avec les oligodésoxynucléotides marqués (MJ échantillon), sont choisies et encore fixées sur un autre filtre de nitrocellulose. Alors, en utilisant 49 colonies, une plus ample hybridation est effectuée pour choisir 9 colonies qui sont plus fortement hybridées par les oligodésoxynucléotides marqués (MJ échantillon).

Selon le processus rapide de séparation des plasmides décrit dans la littérature N° 1, p. 6, on obtient environ $5 \mu\text{g}$ de plasmide de chacune des 9 colonies. Chacun des plasmides obtenus est scindé en utilisant des enzymes de restriction, *Pst*I, *Taq*I, *Rsa*I et *Pvu*II (chacune étant fabriquée et vendue par BRL, Inc., USA), selon le processus décrit dans le manuel du fabricant, avec ensuite électrophorèse effectuée sur un gel agarose à 1% en poids. Alors, les fragments obtenus par scission par les enzymes de restriction respectives sont comparés par rapport à leur longueur.

Les résultats suggèrent que les 9 souches correspondant aux 9 colonies ont la séquence des bases du fragment obtenu par scission par *Pvu*II et *Rsa*I et consistant en environ 50 bp, et que la plus grande partie des 9 souches ont la séquence des bases du fragment obtenu par scission par *Rsa*I et consistant en environ 200 bp. En d'autres termes, les résultats suggèrent que les 9 souches ont des séquences des bases partiellement communes. Les résultats d'analyse par les enzymes de restriction sont montrés à la figure 1.

Sept souches contenant des plasmides désignés au tableau 2 ci-dessous sont mises séparément en culture dans 2 ml d'un milieu LB contenant $10 \mu\text{g/ml}$ de tétracycline, jusqu'à ce que la densité optique des solutions montre les valeurs indiquées au tableau 2 ci-dessous,

avec ensuite centrifugation pour obtenir les souches respectives. Chacune des souches obtenues est séparément ajoutée à 2 ml d'une solution saline physiologique et rompue par sonication. Les solutions obtenues sont soumises à une centrifugation, et l'activité cytotoxique contre les cellules L des liquides surnageants obtenus est déterminée. Les résultats sont montrés au tableau 2 ci-dessous. Comme essai blanc, les mêmes processus que ceux mentionnés ci-dessus sont répétés en utilisant une souche contenant le plasmide pBR322. Les résultats sont également montrés au tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

Plasmide	Nombre de paires de bases recuites	OD ₆₀₀	Activité cytotoxique contre les cellules L (unité/ml)
pB2-2	1400	1,369	35
pB2-3	800	1,605	< 10
pB2-7	1060	1,364	< 10
pR9	1550	1,618	< 10
pR12	1400	1,458	15
pR18	1850	1,438	< 10
pR25	1350	1,514	< 10
pBR322	0	1,677	< 10

L'activité cytotoxique contre les cellules L est éliminée par l'anticorps anti-FNT, mais n'est pas éliminée par le sérum normal de souris. Cela montre que toutes les neuf colonies susmentionnées ont des plasmides qui contiennent des oligodésoxynucléotides codant le FNT.

Etape 10: Détermination de la séquence des bases de l'ADN codant le FNT du lapin

Des souches d'*E. coli* contenant les plasmides pB2-7 et pR18 sont mises en culture dans 1 l du milieu M9 décrit dans la littérature N° 3, p. 440, et contenant $10 \mu\text{g/ml}$ de tétracycline. Alors, selon le processus décrit dans la littérature N° 3, p. 90, chacun des plasmides est isolé en une quantité d'environ $50 \mu\text{g}$.

La séquence des bases de l'insertion de chaque plasmide est déterminée selon le processus chimique de Maxam-Gilbert décrit dans Maxam et autres, *Method in Enzymology*, 55, p. 490 (1980), Academic Press. La séquence des bases ainsi déterminée se révèle être en accord avec les séquences partielles d'acides aminés déterminées à

l'étape 7 de l'exemple référentiel 3. Ainsi, la séquence complète du FNT du lapin est considérée comme étant élucidée.

Etape 11:

Dans cette étape, la construction d'un plasmide est effectuée en utilisant le plasmide recombinant pR12 pour obtenir l'expression directe du FNT dans *E. coli* en utilisant *lac* comme promoteur. Les processus sont montrés à titre d'exemples à la figure 2. D'abord, 10 µg du plasmide pR12 sont digérés avec 10 unités d'*ApaI* (fabriqué et vendu par BRL, Inc., USA) à 37° C pendant 2 heures, et on électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 4% en poids pour isoler des fragments de 630 bp. On isole environ 1 µg du fragment, du gel, par électroélution. De la même façon qu'à l'étape 8 de l'exemple référentiel 3, deux oligodésoxynucléotides montrés à la figure 2, c'est-à-dire 5'-GATCCATGTCAGCTTCTCGGGCC-3' et 5'-CGAGAAGCTGACATG-3', sont synthétisés. Alors, chaque extrémité 5' des oligodésoxynucléotides (environ 100 pmol) est phosphorylée en utilisant la polynucléotide kinase T_4 selon la méthode décrite dans la littérature N° 3, p. 122. Après accomplissement de la réaction, le mélange réactionnel est extrait avec du phénol, puis avec du chloroforme. Alors, les oligomères de synthèse obtenus sont mélangés à 0,5 µg du fragment de 630 bp d'*ApaI* et précipités à l'éthanol. Le fragment est lié avec les oligomères synthétiques à 4° C pendant une nuit en utilisant 10 unités d'ADN ligase T_4 selon le processus décrit dans la littérature N° 1, p. 37. Après accomplissement de la réaction, le mélange réactionnel est précipité dans l'éthanol et digéré avec 20 unités de *BamHI* à 37° C pendant 3 heures, avec ensuite électrophorèse effectuée sur un gel de polyacrylamide à 4% en poids pour récupérer un fragment de 670 bp par électroélution. 1 µg d'un plasmide commercialisé pUC-8 (catalogue N° 4916, fabriqué et vendu par P-L Biochemicals, Inc., USA) est digéré avec *BamHI* et extrait avec du phénol, puis avec du chloroforme, avec ensuite précipitation dans l'éthanol pour obtenir un vecteur. On lie 0,5 µg du vecteur ainsi obtenu au fragment ci-dessus obtenu ayant des sites de *BamHI* à ses deux extrémités et contenant environ 170 bp codant le FNT en utilisant l'ADN ligase T_4 . Selon le processus décrit dans la littérature N° 4, p. 20, *E. coli* est transformé en utilisant le vecteur ci-dessus obtenu et mis en culture sur un milieu d'agar contenant 1mM d'IPTG et 0,004% (poids/volume) de X-gal pour obtenir environ 200 colonies blanches. L'ADN plasmidique est préparé à partir de ces transformants et est digéré avec *BamHI*. Par suite, on trouve que 15 plasmides contiennent le fragment *BamHI* voulu (environ 670 bp). Afin d'examiner la direction d'insertion, les 15 plasmides ci-dessus sont digérés avec *EcoRI* n'ayant qu'un site de reconnaissance sur son pUC-8 et avec *PvuII* n'ayant qu'un site de reconnaissance sur sa partie de fragment d'environ 670 bp, et on électrophorèse sur un gel à 6% en poids de polyacrylamide. Par suite, on détermine que 7 plasmides ont le fragment voulu consistant en environ 140 bp et que la direction de transcription du promoteur *lac* sur pUC-8 est en accord avec celle des oligodésoxynucléotides codant le FNT.

L'analyse de la séquence de l'ADN montre que ces 7 plasmides ont la même séquence et ont la séquence souhaitée des nucléotides aux jonctions entre le promoteur *lac*, l'ADN de synthèse et l'ADNc.

La construction d'autres plasmides est effectuée en utilisant le plasmide recombinant pR17 afin d'obtenir l'expression directe du FNT dans *E. coli* en utilisant *lac UV5* comme promoteur. Les processus sont montrés à titre d'exemples à la figure 3. D'abord, 10 µg du plasmide pR17 sont digérés avec 10 unités d'*ApaI* (fabriqué et vendu par BRL, Inc., USA) à 37° C pendant 2 heures, et on électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 4% en poids pour isoler un fragment consistant en environ 630 bp. On isole du gel, par électroélution, environ 1 µg du fragment. De la même façon qu'à l'étape 8, on fait la synthèse des oligodésoxynucléotides montrés à la figure 3, c'est-à-dire 5'-AATTCATGTCAGCTTCTCGGGCC-3' et 5'-CGAGAAGCTGACATG-3'. Alors, chaque extrémité 5' des deux oligodésoxynucléotides (environ 100 pmol) est phosphorylée en utilisant la polynucléotide kinase T_4 selon la méthode décrite dans la lit-

térature N° 3, p. 122. Après accomplissement de la réaction, le mélange réactionnel est extrait avec du phénol, puis avec du chloroforme. Alors, les oligomères de synthèse sont mélangés à 0,5 µg du fragment *ApaI* précédemment obtenu (environ 630 bp), préparé à partir du plasmide pR17, et précipités à l'éthanol. Le fragment est lié avec les oligomères de synthèse à 4° C pendant une nuit en utilisant 10 unités de ligase T_4 selon le processus décrit dans la littérature N° 1, p. 37. Après accomplissement de la réaction, le mélange réactionnel est précipité dans l'éthanol et digéré avec 20 unités d'*EcoRI* à 37° C pendant 3 heures, avec ensuite électrophorèse effectuée sur un gel de polyacrylamide à 4% en poids pour récupérer un fragment (environ 670 bp) par électroélution.

Selon le processus décrit par F. Fuller, «Gene», 19, pp. 42-54 (1982), on prépare le plasmide pOP95-15.

1 µg de pOP95-15 est digéré avec *EcoRI* et extrait avec du phénol, puis avec du chloroforme, avec ensuite précipitation dans l'éthanol pour obtenir un vecteur. En utilisant l'ADN ligase T_4 , on lie 0,5 µg du vecteur obtenu avec le fragment (environ 670 bp) obtenu par liaison de l'oligonucléotide de synthèse avec l'oligonucléotide codant le FNT. Selon le processus décrit dans la littérature N° 4, p. 20, *E. coli* JM101 (ATCC33876) est transformé en utilisant le vecteur obtenu ci-dessus et mis en culture sur un milieu contenant 1mM d'IPTG et 0,004% (poids/volume) de X-gal pour obtenir environ 150 colonies blanches. L'ADN plasmidique est préparé à partir de 100 de ces colonies et digéré avec *EcoRI*. Par suite, on trouve que 12 plasmides contiennent le fragment voulu d'*EcoRI* (670 bp). Afin d'examiner la direction d'insertion, les 12 plasmides ci-dessus sont digérés avec *PvuII* et *PstI*, et on électrophorèse sur un gel agarose à 1,5% en poids. Par suite, on détermine que 4 plasmides ont les fragments souhaités (environ 1280 bp et environ 2600 bp) et que la direction de transcription du promoteur *lac UV5* est en accord avec celle des oligodésoxynucléotides codant le FNT.

L'analyse des séquences des bases montre que ces 4 plasmides ont la même séquence et que le promoteur *lac UV5*, l'oligodésoxynucléotide de synthèse et l'ADNc sont bien combinés les uns aux autres. Les plasmides obtenus sont désignés par pFNT-lacUV5-1.

Etape 12: Purification du FNT produit par *E. coli*

Des souches d'*E. coli* contenant des plasmides obtenus à l'étape 11 sont mises en culture dans 50 ml du milieu LB contenant de l'ampicilline à 37° C pendant une nuit. Alors, les souches sont transférées à 5 l de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et, de plus, mises en culture à 37° C pendant 3 heures. On ajoute de l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (fabriqué et vendu par Sigma Chemical Company, Inc., USA), jusqu'à une concentration finale de 1mM. Une plus ample mise en culture est effectuée pendant 50 6 heures, avec ensuite refroidissement. Les souches sont recueillies par centrifugation. De la même façon qu'on l'a décrit à l'étape 11, les souches sont ajoutées à 5 l d'une solution 0,04M de tampon tris-HCl (pH 7,8) et brisées par sonication pour obtenir une solution de protéine des souches. La solution obtenue a une activité cytotoxique 55 contre les cellules L de 5×10^7 unités/l.

La solution obtenue est purifiée de la même façon qu'à l'étape 2 de l'exemple référentiel 2 pour obtenir $1,2 \times 10^6$ unités de FNT. L'activité spécifique du FNT est de $6,8 \times 10^7$ unités/mg.

Etape 13: Evaluation en utilisant le sarcome Meth-A transplanté à la souris

2×10^5 cellules de sarcome Meth-A sont transplantées intradermiquement dans la zone abdominale d'une souris BALB/c et, 65 7 jours plus tard, des souris ayant des tumeurs de 7 à 8 mm de diamètre et sans nécrose centrale spontanée sont choisies pour une évaluation. Un échantillon (0,2 ml) du FNT obtenu à l'étape 12 de l'exemple référentiel 3 et dilué avec une solution saline physiologique

est injecté à travers la veine de la queue. L'activité de l'échantillon est évaluée au bout de 24 heures selon les critères suivants :

- (-): pas de changement
 (+): légère nécrose hémorragique
 (++) : nécrose hémorragique modérée (nécrose centrale s'étendant sur environ 50% de la surface de la tumeur)
 (+++) : nécrose hémorragique marquée (nécrose massive laissant un petit bourrelet viable sur le pourtour de la tumeur)

20 jours après l'injection de l'échantillon, des observations sont faites concernant la dégénération des tumeurs, et le taux de rétablissement est déterminé selon l'expression qui suit :

$$\text{Taux de rétablissement} = \frac{\text{Nombre de souris qui se sont totalement rétablies de la tumeur}}{\text{Nombre de souris utilisées pour l'essai}}$$

Les résultats sont montrés au tableau 3.

Tableau 3

Quantité injectée de FNT du lapin produit par <i>E. coli</i> (unités/souris)	Nombre de souris utilisées pour l'essai	Evaluation de l'activité des échantillons (au bout d'un jour)				Taux de rétablissement (au bout de 20 jours)
		-	+	++	+++	
2 × 10 ⁵	5	0	0	1	4	5/5
Référence (saline physiologique)	5	5	0	0	0	0/5

Exemple 1

Etape 1: Transformation de la souche MC1061 d'*E. coli* K-12 par les plasmides pR18, pB2-7 et pB2-2

Des colonies de la souche MC1061 d'*E. coli* K-12 sont transformées avec chacun des plasmides pR18, pB2-7 et pB2-2 que l'on obtient à l'exemple référentiel 3 selon les processus habituels. Plus particulièrement, des colonies de la souche MC1061 d'*E. coli* K-12 sont mises en culture dans le milieu LB jusqu'à ce que la densité optique du bouillon de culture devienne de 0,3 à 550 nm. On recueille 50 ml de la culture d'*E. coli*, on lave avec un mélange de 25 ml contenant 10mM de MOPS (pH 7,0) et 10mM de RbCl, et on remet en suspension dans 25 ml d'un mélange contenant 0,1M de MOPS (pH 6,5), 50mM de CaCl₂ et 10mM de RbCl. La suspension résultante est refroidie sur de la glace pendant 30 minutes, centrifugée et mise en suspension dans un mélange de 2 ml du mélange susmentionné contenant 0,1M de MOPS (pH 6,5), 50mM de CaCl₂ et 10mM de RbCl et 30 µl de DMSO. A une portion de 200 µl de la suspension résultante, on ajoute séparément 10 µl de chacune des solutions d'ADN plasmidique. Chacun des mélanges résultants est refroidi sur de la glace pendant 30 minutes, puis subit un choc thermique à 44° C pendant 60 secondes. Immédiatement après, 5 ml du milieu LB préchauffé à 37° C sont ajoutés à chacun des mélanges chauffés, avec ensuite incubation à 37° C pendant 1 heure. Chacun des bouillons de culture obtenus est soumis à une centrifugation pour former des boulettes de cellules. Le liquide surnageant est évacué et le milieu LB est ajouté et agité pour remettre chacune des boulettes de cellules en suspension. Chacune des suspensions résultantes est inoculée à une plaque d'agar LB contenant 30 µg/ml de tétracycline, avec ensuite incubation à 37° C pendant une nuit. Par suite, on obtient des colonies de transformants résistant à la tétracycline, chacun étant transformé par les plasmides pR18, pB2-7 et pB2-2.

Etape 2: Préparation d'ADN plasmidique pB2-7 et pR18

Chacun des transformants respectivement transformés avec les plasmides pB2-7 et pR18 que l'on obtient à l'étape 1 est soumis à 1) une croissance du transformant et une amplification du plasmide; 2) une récolte et une lyse du transformant, et 3) une purification de l'ADN plasmidique, selon les processus décrits aux pages 88-96 de T. Maniatis, E.F. Fritsch et J. Sambrook, «Molecular Cloning», publié par Cold Spring Harbor Laboratory, USA. A titre d'exemple, chacun des transformants est inoculé dans le milieu LB et 30 µg/ml de tétracycline, incubé à 37° C sous agitation vigoureuse. Cette étape est répétée pour atteindre une croissance du transformant et une amplification du plasmide. La culture de transformants est recueillie

par centrifugation à 4000 g pendant 10 minutes à 4° C. Le liquide surnageant est rejeté. La boulette résultante est lavée dans 100 ml de STE froid-glace [0,1M de NaCl, 10mM de tris-Cl (pH 7,8) et 1mM d'EDTA] et est soumise à une lyse par ébullition en utilisant 20 mg/ml de lysozyme et 10mM de tris-Cl, pH 8,0. Le produit visqueux est transféré à un tube d'ultracentrifugeuse, et on centrifuge à 25 000 tr/min pendant 30 minutes à 4° C pour obtenir une solution d'ADN. Le volume de la solution d'ADN est mesuré. Pour chaque millilitre, on ajoute exactement 1 g de chlorure de césium et on mélange doucement jusqu'à ce que tout le sel soit dissous. On ajoute 0,8 ml d'une solution de bromure d'éthidium (10 mg/ml dans H₂O), pour 10 ml de la solution de chlorure de césium. La densité finale de la solution est de 1,55 g/ml et la concentration du bromure d'éthidium est d'environ 600 µg/ml. La solution de chlorure de césium est transférée à un tube approprié à la centrifugation, et le restant du tube est rempli d'huile de paraffine légère. La centrifugation est entreprise à 45 000 tr/min pendant 36 heures à 20° C pour obtenir deux bandes d'ADN, sa bande supérieure consistant en ADN bactérien linéaire et en ADN plasmidique circulaire entaillé et sa bande inférieure consistant en ADN plasmidique circulaire fermé. La bande inférieure d'ADN est recueillie dans un tube en verre par une aiguille hypodermique insérée dans le côté du tube. Le bromure d'éthidium est retiré, et la phase aqueuse est dialysée par rapport à TAE. La solution d'ADN plasmidique est traitée avec RNase et extraite avec un volume égal de phénol équilibré. La phase aqueuse est mise en couche sur une colonne de Bio-Gel A-150 équilibrée dans TAE (pH 8,0) et 0,1% de SDS. L'ADN dans la colonne est lavé et un réservoir de TE avec 0,1% de SDS est appliqué pour recueillir les fractions. Les fractions sont précipitées avec l'éthanol pour obtenir un ADN plasmidique pur.

En entreprenant les processus ci-dessus, on obtient 250 µg d'ADN plasmidique pB2-7 pur et 134 µg d'ADN plasmidique pR18 pur.

Etape 3: Translation de l'entaille des ADN plasmidiques pB2-7 et pR18 purs

De l'ADN plasmidique pB2-7 pur obtenu à l'étape 2, on prend 40 µg que l'on digère avec l'enzyme de restriction *Pst*I, et on soumet à une électrophorèse à travers 4% de gel d'acrylamide. Après l'électrophorèse, l'ADN est teinté et la bande souhaitée est découpée pour isoler une insertion de *Pst*I.

En utilisant 500 ng de l'insertion isolée de *Pst*I, la translation d'entaille est effectuée à la façon décrite dans Maniatis, T., et autres, «Proc. Natl. Acad. Sci.», USA, 72, 1184 (1975). Pour la translation d'entaille, l'appareil de translation d'entaille (produit et vendu par

BRL, Inc., USA) est employé, et on applique 80 pmol de dCTP radioactif dans un système réactionnel de 25 µl (à 400 Ci/mmol). A un mélange consistant en:

- 2,5 µl de la solution A (solutions de dNTP)
- 2,5 µl de la solution B (500 ng d'ADN d'essai par rapport à l'insertion de *Pst*I)
- 5 µl de dCTP chaud (3200 Ci/mmol)
- 1,3 µg de CTP froid (65 pmol, 50 pmol/µl de dCTP)
- 11,2 µl de la solution E (H₂O)
- 22,5 µl (total)

on ajoute 2,5 µl de la solution C (DNaseI, ADN Polymérase I), et on fait réagir à 15° C pendant 60 minutes. Alors, la solution D (tampon d'arrêt) est ajoutée au mélange résultant pour arrêter la réaction. D'autre part, l'ARNt de support est ajouté, on soumet deux fois à une précipitation dans l'éthanol et on dissout dans 500 µl d'eau. L'activité spécifique par µg d'ADN est de $9,3 \times 10^7$ cpm.

Etape 4: Préparation du fragment d'insertion *Rsa*I de l'ADN plasmidique pR18

80 µg de l'ADN plasmidique pR18 sont digérés avec l'enzyme de restriction *Rsa*I, et on soumet à une électrophorèse à travers 4% de gel de polyacrylamide. Les bandes souhaitées d'insertions qui suivent sont découpées et purifiées au moyen de la colonne BND:

- environ 640 bp 3,77 µg (récupération 52%)
- environ 175 bp 1,77 µg (récupération 50%)

L'insertion ci-dessus d'environ 640 bp est désignée par le fragment 3' de pR18 (ce qui signifie la région 3' non traduite de pR18), et l'insertion ci-dessus d'environ 175 bp est désignée par pR18-cfr (ce qui signifie la région de codage de pR18).

Par ailleurs, les processus ci-dessus sont répétés en utilisant les enzymes de restriction *Pst*I et *Mst*II au lieu de l'enzyme de restriction *Rsa*I pour obtenir la bande qui suit:

- environ 450 bp 3,65 µg (récupération 60%)

L'insertion ci-dessus est désignée comme le fragment 5' de pR18.

Etape 5: Isolement du gène de FNT génomique humain

L'insertion de plasmide pB2-7 marqué ³²P que l'on obtient à l'étape 3 de l'exemple 1 est utilisée comme échantillon d'hybridation pour sélectionner 10⁶ plaques de génothèque de bactériophage Charon 4A/humain préparées par l'insertion dans le site de liaison d'*Eco*RI de Charon 4A [Blattner et autres, «Science», 196, 161 (1977)] de fragments dimensionnés à partir d'ADN humain partiellement digéré [Maniatis et autres, «Cell», 15, 687 (1978)]. La méthode d'hybridation des plaques de Benton et Davis [Benton et Davis, «Science», 196, 180 (1977)] est utilisée. Comme tout le bactériophage de la culture de départ ne contient pas la matière génétique nécessaire pour la préparation du FNT humain, un échantillon, qui a une séquence de bases complémentaire du gène de FNT du lapin, est utilisée. L'ADN des plaques de phage ayant la matière génétique souhaitée incorpore l'échantillon radioactif, et on les identifie par leur radioactivité. Neuf plaques hybridantes sont isolées de la génothèque.

Les processus et conditions utilisés sont comme suit:

1. *Nombre de plaques:*
Environ 1×10^6 plaques (environ 4×10^4 plaques/plaque
Ø 150 mm × 25)
2. *Transfert à des filtres de nitrocellulose:*
[Voir Benton et Davis, «Science», 196, 186 (1977)]
3. *Hybridation:*
Addition de $1,25 \times 10^5$ cpm/ml d'échantillon d'insertion pB2-7 préparé à l'étape 3 de l'exemple 1, 42° C, 19,5 heures
4. *Lavage:*
 $2 \times$ SSC - 0,1% SDS à la température ambiante
Immersion 10 minutes × 4
↓
 $1 \times$ SSC - 0,1% SDS à 50° C
Immersion 30 minutes × 2

5. Exposition:

- XAR-5 (Eastman Kodak Company, USA)
- 80° C, 2 écrans d'intensification, 39 heures

Dans la sélection ci-dessus, on obtient 12 souches candidates. De la même façon qu'on l'a mentionné ci-dessus, une seconde sélection est effectuée pour obtenir 9 souches contenant le fragment voulu. En utilisant ces souches, une troisième sélection est effectuée de la même façon qu'on l'a mentionné ci-dessus pour obtenir 9 souches contenant le fragment voulu. En utilisant les souches obtenues, une quatrième sélection est effectuée pour confirmer que les 9 souches contiennent le fragment voulu. Les 9 bactériophages obtenus contenant le fragment voulu sont désignés par HG-1 à HG-9, respectivement.

Etape 6: Isolement du gène de FNT génomique du lapin

On répète sensiblement le même processus que décrit à l'étape 5 de l'exemple 1, à l'exception que l'on utilise $6,7 \times 10^5$ plaques de génothèque de bactériophage Charon 4A/lapin que l'on prépare en utilisant l'ADN du lapin digéré [Maniatis et autres, «Cell», 15, 687 (1978)] au lieu d'ADN humain digéré, au lieu des 10⁶ plaques de la génothèque bactériophage Charon A4/humaine. Ainsi, on obtient 2 souches de bactériophage (RG-1 et RG-2) contenant le gène de FNT génomique du lapin.

Etape 7: Analyse de maculage de Southern de clones humains

En utilisant les bactériophages HG-3, HG-6 et HG-7 obtenus à l'étape 5 de l'exemple 1, on obtient l'ADN de chaque bactériophage selon les processus qui suivent.

On met 6×10^{10} cellules d'*E. coli* LE392 (cellule hôte) en suspension dans 18 ml de SM et on ajoute 3×10^9 PFU de bactériophage HG-3, permettant ainsi à *E. coli* d'être infecté à 37° C pendant 20 minutes. Alors, le mélange obtenu est ajouté à 3 l de bouillon NZ et est soumis à une culture sous agitation à 37° C pendant 23 heures. On ajoute 60 ml de CHCl₃ au mélange et on soumet encore à une culture sous agitation pendant 30 minutes. NaCl est ajouté au mélange jusqu'à une concentration finale de 1M, on laisse le mélange au repos pendant 15 minutes, avec ensuite centrifugation pour obtenir le liquide surnageant. Alors, on ajoute du polyéthylène glycol (poids moléculaire: environ 6000) au mélange de façon que la concentration de polyéthylène glycol soit de 10% (poids/volume), et on laisse au repos pendant 22 heures à 4° C. Les bactériophages sont recueillis par centrifugation. Les bactériophages obtenus sont mis en suspension dans 28 ml de SM et on ajoute un volume égal de CHCl₃. Après agitation au moyen d'un appareil Vortex pendant 30 secondes, le mélange est soumis à une centrifugation pour obtenir une phase aqueuse. On ajoute SM à la phase aqueuse de façon que la quantité totale soit de 30 ml. On ajoute 26,4 g de CsCl au mélange obtenu et on dissout doucement, avec ensuite ultracentrifugation (45 000 tr/min, 20 heures) pour obtenir les bactériophages sous la forme d'une bande. Le mélange obtenu contenant les bactériophages est par rapport à 10mM de NaCl - 50mM de tris (pH 8) - 10mM de MgCl₂. Alors, on ajoute EDTA, la protéinase K et SDS au mélange de façon que leurs concentrations soient de 20mM, 50 µg/ml et 0,5% (poids/volume), respectivement. Alors, le mélange est traité à 65° C pendant 1 heure et est extrait avec du phénol, un mélange de phénol et de CHCl₃ (1:1 en volume), puis avec CHCl₃. La phase aqueuse ainsi obtenue est dialysée par rapport à 10mM de tris (pH 8) - 2mM d'EDTA. La mesure d'absorption ultraviolette de la phase aqueuse obtenue montre que l'on obtient l'ADN pur du bactériophage HG-3.

On répète sensiblement les mêmes processus que décrit par rapport à la préparation de l'ADN du bactériophage HG-3 pour obtenir les ADN des bactériophages HG-6 et HG-7.

Ainsi, on obtient 2920 µg de HG-3, 1100 µg de HG-6 et 819 µg de HG-7.

Selon la méthode de Southern [E.M. Southern, «J. Mol. Biol.», 98, 503 (1975)], l'analyse de maculage de Southern des ADN obtenus est accomplie. Les processus et conditions sont comme suit:

1. *ADN*:
 - HG-3 825 ng chacun
 - HG-6 935 ng chacun
 - HG-7 685 ng chacun
 2. *Digestion avec diverses enzymes de restriction*:
 - 10 unités *Bam*HI, 10 unités *Eco*RI
 - 10 unités *Bam*HI + 10 unités *Eco*RI
 - 10 unités *Hind*III
 - 10 unités *Hind*III + 10 unités *Eco*RI
 - 10 unités *Pvu*II
 - 37° C, 3 heures
 3. *Electrophorèse*:
 - 0,8% gel agarose
 - TAE
 - 28 V, 15,5 heures
 4. *Transfert à des filtres de nitrocellulose*:
 - [Voir E.M. Southern, «J. Mol. Biol.», 98, 503 (1975)]
 5. *Préhybridation*:
 - 30 ml de FDSS
 - 42° C, 6 heures
 6. *Hybridation*:
 - Fragment 5' (1 × 10⁵ cpm/ml) de pR18 (préparé à l'étape 4 de l'exemple 1)
 - 42° C, 14 heures
 7. *Lavage*:
 - 2 × SSC – 0,1% SDS à la température ambiante
 - ↓
 - 1 × SSC – 0,1% SDS à 50° C
 - Immersion 30 minutes × 2
 8. *Exposition*:
 - XAR-5 (Eastman Kodak Company, USA)
 - 80° C, 2 écrans d'intensification, 14 heures
- Les résultats de l'hybridation sont montrés au tableau 4.

Tableau 4

Enzyme	Clone bactériophage	Dimension du fragment d'hybridation avec échantillon (pR18)	
		Extrémité 5'	Extrémité 3'
<i>Bam</i> HI	HG-3	6,7 kb	←
	HG-6	11,2 kb	←
	HG-7	9,2 kb	←
<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	HG-3	2,9 kb	←
	HG-6	2,9 kb	←
	HG-7	2,9 kb	←
<i>Eco</i> RI	HG-3	2,9 kb	←
	HG-6	2,9 kb	←
	HG-7	2,9 kb	←
<i>Hind</i> III + <i>Eco</i> RI	HG-3	2,9 kb	←
	HG-6	2,9 kb	←
	HG-7	2,9 kb	←
<i>Hind</i> III	HG-3	9,7 kb	←
	HG-6	4,1 kb	←
	HG-7	9,7 kb	←
<i>Pvu</i> II	HG-3	2,2 kb	0,9 kb
	HG-6	1,9 kb	0,9 kb
	HG-7	2,2 kb	0,9 kb

Note: Le symbole ← signifie que le même fragment s'hybride.

Etape 8: Analyse de maculage de Southern des clones du lapin

On répète sensiblement les mêmes processus qu'à l'étape 7 de l'exemple 1, à l'exception que chacun des bactériophages RG-1 et RG-2 est utilisé au lieu de chacun des bactériophages HG-3, HG-6 et HG-7. Ainsi, on accomplit l'analyse de maculage de Southern. Par suite, on trouve que le fragment 5' de pR18 est hybridé avec un seul fragment d'une bande de fragments que l'on obtient par scission de RG-1 et RG-2 avec chacun de *Bam*HI, *Eco*RI, *Bgl*II, *Hind*III et *Bam*HI + *Eco*RI.

Etape 9: Construction des clones bactériens contenant le gène de FNT génomique humain

La méthode de Landy et autres [«Biochemistry», vol. 13, 2134 (1974)] est utilisée pour obtenir l'ADN de HG-3, comme on l'obtient

à l'étape 5 ci-dessus. 33 µg de l'ADN HG-3 résultant sont digérés avec 80 unités d'*Eco*RI à 37° C pendant 3 heures. Le condensé subit une électrophorèse sur 1% de gel agarose à faible point de fusion (conditions: 1 × TAE, 20 V, 14,5 heures). La bande de 2,9 kb est isolée du gel agarose comme décrit par T. Maniatis [«Molecular Cloning», Cold Spring Harbor Laboratory, p. 377 (1982)]. Plus particulièrement, le gel découpé de la partie de bande de 2,9 kb est chauffé à 65° C pendant 15 minutes. Le fragment de HG-3 scindé par *Eco*RI ayant une longueur de 2,9 kb (souvent appelé ci-après «fragment de 2,9 kb de HG-3/*Eco*RI») est récupéré du gel fondu par extraction trois fois avec du phénol, puis trois fois avec un autre solvant d'extraction, avec ensuite précipitation avec de l'éthanol contenant de l'acétate d'ammonium. Ainsi, on obtient 637 ng (rendement: environ 30%) de fragment de 2,9 kb de HG-3/*Eco*RI.

On lie 255 ng du fragment ci-dessus obtenu à 56,5 ng de pUC13 scindé par *EcoRI* [J. Messing, «Methods in Enzymology», vol. 101, 20 (1983)] en utilisant 2,5 unités de ligase T_4 à 4° C pendant 20 heures.

La souche JM83 d'*E. coli* K-12 est transformée en utilisant le produit de liaison ci-dessus obtenu. Plus particulièrement, la souche JM83 d'*E. coli* K-12 est mise en culture dans le milieu LB jusqu'à ce que la densité optique du bouillon de culture soit de 0,3 à 550 nm. On recueille 50 ml de la culture de la souche JM83 d'*E. coli* K-12, on lave avec 25 ml de 1mM de MOPS (pH 7,0) - 10mM de RbCl et on remet en suspension dans 25 ml de 0,1M de MOPS (pH 6,5) - 5mM $CaCl_2$ - 10mM RbCl. La suspension est refroidie sur de la glace pendant 30 minutes, centrifugée et remise en suspension dans un mélange de 2 ml de 0,1M MOPS (pH 6,5) - 50mM $CaCl_2$ - 10mM RbCl et 30 μ l de DMSO. A 203 μ l de la suspension, on ajoute 10 μ l d'une solution aqueuse d'un produit de liaison contenant 10 ng du produit de liaison. Le mélange est refroidi sur de la glace pendant 30 minutes, puis est chauffé à 40° C pendant 60 secondes. Immédiatement après, on ajoute au mélange chauffé 5 ml de bouillon LB préchauffé à 37° C, avec ensuite incubation à 37° C pendant 1 heure. Le bouillon de culture obtenu est soumis à une centrifugation et le liquide surnageant est retiré. Un milieu LB est ajouté à la boulette résultante de cellules, puis on inocule sur une plaque de LB contenant 30 μ g/ml d'ampicilline et 40 μ g/ml de X-gal. Des colonies contenant la souche JM83 d'*E. coli* K-12, qui ont été transformées avec les plasmides ayant l'insertion, sont blanches, tandis que celles contenant la souche JM83 d'*E. coli* K-12, qui ont été transformées avec le plasmide seul, sont bleues. Les colonies blanches obtenues sont inocuées de nouveau sur une plaque LB contenant 30 μ g/ml d'ampicilline et 40 μ g/ml de X-gal dans le but d'une confirmation.

Des colonies blanches ci-dessus obtenues, on choisit 10 colonies (clones bactériens) et on sélectionne en utilisant une technique «mini-prep».

Plus particulièrement, chaque colonie est mise en culture pendant une nuit dans le milieu LB contenant 30 μ g/ml d'ampicilline. Les cellules en croissance sont recueillies et mises en suspension dans 2 mg/ml d'une solution comprenant du lysozyme - 50mM de glucose - 10mM d'EDTA - 25mM de tris-HCl (pH 8,0). On laisse la suspension au repos à la température ambiante pendant 5 minutes, avec ensuite addition de 200 μ l de 0,2N NaOH - 1% SDS. Après lente agitation, on laisse la suspension au repos à la température ambiante pendant 2 minutes. Ensuite, on ajoute 150 μ l d'acétate de sodium 3M (pH 5,2), et on laisse au repos à -20° C pendant 10 minutes, avec ensuite centrifugation pendant 15 minutes pour récupérer le liquide surnageant résultant. Au liquide surnageant, on ajoute 900 μ l d'éthanol froid, avec ensuite centrifugation pendant 5 minutes pour obtenir le précipité résultant. Le précipité obtenu est lavé avec 70% d'éthanol et séché pour obtenir un ADN plasmidique. Dans la méthode susmentionnée, 10 ADN plasmidiques sont obtenus. Chaque ADN plasmidique est dissous dans 10mM de tris - 0,1mM d'EDTA (pH 8,0), digéré avec *EcoRI* et soumis à une électrophorèse pour une analyse par restriction. Les conditions de digestion et d'électrophorèse sont comme suit:

Digestion: solution d'ADN plasmidique, 1/3 de la quantité préparée ci-dessus; *EcoRI*, 3 unités, 37° C, 1,5 heure.

Electrophorèse: 1% de gel agarose; 1 \times TAE; 120 V; 2 heures.

L'analyse par restriction ci-dessus montre que huit des dix clones sont positifs. En effet, les huit clones ont un fragment de 2,9 kb. Des huit clones positifs, un clone est choisi et est désigné par souche JM83 (pHGE) d'*E. coli* K-12 (ATCC39656).

On répète sensiblement les mêmes processus qu'à l'étape 2 ci-dessus pour préparer 1,89 mg d'ADN de pHGE, à l'exception que l'on utilise la souche JM83 (pHGE) d'*E. coli* K-12 au lieu d'*E. coli* récoltant pB2-7 et pR18.

Etape 10: Sous-clonage de RG-1 scindé par *EcoRI*

On digère 30 μ g de RG-1 tel que préparé à l'étape 6 ci-dessus avec *EcoRI*. Du mélange de fragments résultant, le fragment ayant une longueur d'environ 3,5 kb est récupéré sensiblement de la même manière qu'à l'étape 9 ci-dessus, à l'exception que l'on utilise le mélange de fragments ci-dessus préparé et 0,8% de gel agarose à faible point de fusion. On obtient 1,0 μ g du fragment RG-1 scindé par *EcoRI* (environ 3,5 kb). Le fragment de RG-1 scindé par *EcoRI* (3,5 kb) ci-dessus obtenu est lié à pUC13 digéré par *EcoRI* sensiblement de la même façon qu'à l'étape 9 ci-dessus, à l'exception que le fragment scindé par *EcoRI* (3,5 kb) ci-dessus obtenu est utilisé au lieu du fragment HG-3 scindé par *EcoRI* (2,9 kb).

La transformation de la souche JM83 d'*E. coli* K-12, la sélection des clones bactériens, la digestion des clones et l'électrophorèse sont effectuées sensiblement de la même façon qu'à l'étape 9 ci-dessus, à l'exception que le produit de liaison ci-dessus obtenu est utilisé. Le clone obtenu est désigné par la souche JM83 (pRGE) d'*E. coli* K-12 (ATCC39655).

On répète sensiblement les mêmes processus qu'à l'étape 2 ci-dessus pour préparer 1,70 mg d'ADN de pRGE, à l'exception que l'on utilise la souche JM83 (pRGE) d'*E. coli* K-12 au lieu de pB2-7 et pR18.

Etape 11: Analyse de l'enzyme de restriction de l'ADN plasmidique pHGE

L'analyse de l'enzyme de restriction de l'ADN de pHGE obtenue à l'étape 9 ci-dessus est effectuée selon la méthode décrite dans Maniatis [«Molecular Cloning», Cold Spring Harbor Laboratory, 98 (1982)].

Les processus et conditions utilisés sont comme suit:

1. Digestion de l'ADN de pHGE avec *EcoRI*:

18,6 μ g d'ADN de pHGE
64 unités d'*EcoRI*
37° C, 2 heures

2. Précipitation dans l'éthanol:

Précipite

3. Addition d'eau distillée au précipité:

Préparation de 1 μ g/ml d'une solution de pHGE scindé par *EcoRI*

4. Digestion avec diverses enzymes de restriction:

1 μ g de pHGE/*EcoRI*
Enzyme de restriction: 5 unités de *PvuII*, 5 unités de *PvuII* + 10 unités de *RsaI*, 10 unités de *RsaI*, 4 unités de *MstII*, 3 unités d'*AvaI*, 9 unités de *PstI*
37° C, 2 heures

5. Electrophorèse:

2% gel agarose, 1 \times TAE
28 V, 14,5 heures

6. Transfert au filtre de nitrocellulose:

[Voir E.M. Southern, «J. Mol. Biol.», 98, 503 (1975)]

7. Première préhybridation:

30 ml de FDSS
42° C, 6 heures

8. Première hybridation:

Fragment 5' (5 \times 10⁴ cpm/ml) de pR18 (préparé à l'étape 4 ci-dessus)
42° C, 14 heures

9. Lavage:

2 \times SSC - 0,1% SDS à la température ambiante
Immersion 10 minutes \times 4

↓
1 \times SSC - 0,1% SDC à 50° C
Immersion 30 minutes \times 2

10. Exposition:

XAR-5 (Eastman Kodak Company, USA)
-80° C, 2 écrans d'intensification, 17,5 heures

11. *Rinçage:*
0,5M NaOH - 1,5M NaCl (immersion: 1 minute)
0,5M tris - 1,5M NaCl (immersion: 1 minute)
↓
3 × SSC (immersion: 1 minute)
12. *Exposition:*
Effectuée de la même façon qu'à l'étape 10 ci-dessus, à l'exception que le temps d'exposition est de 19 heures
13. *Seconde préhybridation:*
De la même façon qu'à l'étape 7 ci-dessus
14. *Seconde hybridation:*
Insertion pB2-7 (préparée à l'étape 3 ci-dessus)
42° C, 16,5 heures
15. *Lavage:*
De la même façon qu'à l'étape 9 ci-dessus
16. *Exposition:*
De la même façon qu'à l'étape 10 ci-dessus, à l'exception que la durée d'exposition est de 19,5 heures
17. *Rinçage:*
De la même façon qu'à l'étape 11 ci-dessus
18. *Exposition:*
De la même façon qu'à l'étape 10 ci-dessus, à l'exception que la durée d'exposition est de 20 heures
19. *Troisième préhybridation:*
De la même façon qu'à l'étape 7 ci-dessus
20. *Troisième hybridation:*
Fragment 3' (4,5 × 10⁵ cpm/ml) de pR18 (préparé à l'étape 4 ci-dessus)
42° C, 15 heures
21. *Lavage:*
De la même façon qu'à l'étape 9 ci-dessus
22. *Exposition:*
De la même façon qu'à l'étape 10 ci-dessus
- Les résultats de l'analyse de l'enzyme de restriction sont montrés à la figure 4.

Etape 12: Analyse de l'enzyme de restriction de l'ADN plasmidique pRGE

L'analyse de l'enzyme de restriction de l'ADN plasmidique pRGE préparée à l'étape 10 ci-dessus est effectuée sensiblement de la même façon qu'à l'étape 11 ci-dessus, à l'exception que l'on utilise l'ADN plasmidique pRGE au lieu de l'ADN plasmidique pHGE. La carte de restriction de l'insertion d'ADN de pRGE obtenue est montrée à la figure 5.

Etape 13: Détermination des séquences de bases du gène de FNT du lapin et du gène de FNT humain

On répète sensiblement les mêmes processus qu'à l'étape 2 ci-dessus, à l'exception que l'on utilise la souche JM83 (pHGE) d'*E. coli* K-12 obtenue à l'étape 9 ci-dessus et la souche JM83 (pRGE) d'*E. coli* K-12 obtenue à l'étape 10 ci-dessus au lieu de la souche MC1061 d'*E. coli* K-12 ayant pB2-7 et la souche MC1061 d'*E. coli* K-12 ayant pR18. Ainsi, on obtient 150 µg de chacun des ADN plasmidique pRGE et plasmidique pHGE.

Les séquences de bases de pRGE et de pHGE sont déterminées selon la méthode de Maxam-Gilbert [Maxam et autres, «Methods in Enzymology», vol. 55, 490 (1980), publiée par Academic Press].

La séquence des bases de pR18 déterminée à l'exemple référentiel 3 est comparée à celle de pRGE déterminée ci-dessus pour élucider la structure, comprenant l'exon et l'intron, du gène de FNT du lapin. La structure de l'insertion d'ADN de pRGE est montrée à la figure 5. Subséquemment, la séquence des bases de pRGE est comparée à celle de pHGE pour rechercher l'homologie et la séquence de consensus autour de la limite entre l'intron et l'exon. Ainsi, la structure, comprenant l'exon et l'intron, du gène de FNT humain est élucidée. La structure du gène de FNT humain est montrée à la figure 4.

La séquence des bases ci-dessus obtenue codant pour le FNT du lapin et le FNT humain sera montrée ci-après. Dans les séquences des bases, la rangée supérieure montre la séquence de bases codant pour le FNT du lapin (R) et la rangée inférieure la séquence de bases codant pour le FNT humain (H).

R	TCA	GCT	TCT	CGG	GCC	CTG	AGT	GAC	AAG	CCT	CTA	GCC	CAC	GTA	GTA
H	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA
R	GCA	AAC	CCG	CAA	GTG	GAG	GGC	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AGC	CAG	CGT
H	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG
R	GCG	AAC	GCC	CTG	CTG	CGC	AAC	GGC	ATG	AAG	CTC	ACG	GAC	AAC	CAG
H	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG
R	CTG	GTG	GTG	CCG	GCC	GAC	GGG	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT
H	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC
R	CTC	TTC	AGC	GGT	CAA	GGC	TGC	CGC	TCC	...	TAC	GTG	CTC	CTC	ACT
H	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC
R	CAC	ACT	GTC	AGC	CGC	TTC	GCC	GTC	TCC	TAC	CCG	AAC	AAG	GTC	AAC
H	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC
R	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TCG	CAC	CGG	GAG	ACC	CCC	GAG
H	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG
R	GAG	GCT	GAG	CCC	ATG	GCC	TGG	TAC	GAG	CCC	ATC	TAC	CTG	GGC	GGC
H	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG
R	GTC	TTC	CAG	TTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGG	CTC	AGC	ACC	GAG	GTC	AAC
H	GTC	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT
R	CAG	CCT	GAG	TAC	CTG	GAC	CTT	GCC	GAG	TCC	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT
H	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT
R	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG										
H	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG										

Note:

Le symbole ... signifie que cette partie dans la séquence de bases de l'ADN codant le FNT du lapin est nulle et que, par conséquent, deux codons adjacents à ce symbole de ses deux côtés sont directement connectés.

Etape 14: Synthèse des oligodésoxynucléotides

Dans un récipient réactionnel en acier inoxydable de 500 µl avec des filtres en acier inoxydable à chaque extrémité, on ajoute 20 mg d'une résine de polystyrène à laquelle un nucléoside (2,0 µM) est

connecté par une liaison succinate. La résine est traitée avec du bromure de zinc (1 μM) dans le dichlorométhane-isopropanol (85:15) pour retirer le groupe protecteur de diméthoxytrityle (DMT), est lavée avec du diméthylformamide, de la pyridine et de l'acétonitrile et est séchée avec un courant d'azote. A la résine séchée, on ajoute une solution de DMT-nucléotide (20 μM) et de mésitylènesulfonylnitrotriazote (60 μM) dans 200 μl de pyridine. On laisse la réaction de couplage se passer à 45° C pendant 20 minutes. Ce cycle de suppression de la protection et de couplage est répété pour des nucléotides successifs jusqu'à ce que l'oligodésoxynucléotide souhaité soit assemblé sur la résine. La résine est alors traitée pour retirer l'oligodésoxynucléotide et est purifiée comme décrit par Ito, Ike, Ikuta et Itakura [«Nuc. Ac. Res.», 10:1755 (1982)].

Ainsi, on obtient les oligodésoxynucléotides qui suivent:

1. 5'-AATTCATGTCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAA-3'
2. 3'-GTACAGTAGAAGAGCTTGGGGCTCAGTGTTCGG-5'
3. 5'-GCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCCCTCAAGC-3'
4. 3'-ACATCGGGTACAACATCGTTTGGGAGTTCGACT-5'

Etape 15: Construction de M13mp9-HGE contenant le minigène humain pour le FNT

Le plasmide pHGE (10 μg) est digéré avec *EcoRI* (20 unités). Après électrophorèse sur un gel agarose à 1% à faible point de fusion, le fragment de 2,9 kb est élué. Ce fragment est inséré dans le fragment d'*EcoRI* de la forme reproductive de M13mp9 phage. Le M13mp9 phage est choisi parce qu'il est particulièrement adapté à la réception de sections de l'ADN. Le produit est transféré à *E. coli* JM103 [BRL, Inc., USA, «Manuel de l'utilisateur/M13mp7 Cloning/Dideoxy Sequencing» (1980)]. Le produit est désigné par M13mp9-HGE.

Etape 16: Délétion d'intron 3, en utilisant l'ADN à un seul brin de M13mp9-HGE et le délétère E3-4

L'ADN à un seul brin de M13mp9-HGE est préparé par la méthode de BRL, «Manuel de l'utilisateur/M13mp7 Cloning/Dideoxy Sequencing» (1980).

On utilise l'oligodésoxynucléotide N° 4 3'-ACATCGGGTACA-ACATCGTTTGGGAGTTCGACT-5' préparé à l'étape 14, comme délétère de l'intron 3. Le délétère de l'intron 3 est désigné par «E3-4».

Le délétère E3-4 a une séquence de bases qui est complémentaire de la séquence de bases des bases avant (Exon 3) et après (Exon 4) l'intron 3 qui doit être délaissé. La délétion de l'intron 3 est effectuée, selon l'enseignement de Wallace et autres, «Science», 209:1396 (1980), comme suit.

E3-4 (164 ng, 15 pmol) est phosphorylé en utilisant la kinase T_4 et ATP (3mM), et on ajoute à l'étalon M13mp9-HGE (1,65 μg , 0,5 pmol). Le mélange réactionnel est chauffé à 65° C, refroidi à la température ambiante pendant 5 minutes et, enfin, refroidi dans de l'eau glacée. A dATP, dCTP, dGTP, dTTP et ATP (0,4mM), on ajoute un fragment de Klenow (5 unités), la ligase T_4 (10 unités) dans un tampon Hin [Wallace et autres, «Nuc. Ac. Res.», 9, 3647 (1981)], 10mM de tris-HCl (pH 7,2), 2mM de MgCl_2 et 1mM de β -mercaptoéthanol. Le mélange réactionnel (volume final 50 μl) est incubé pendant 30 minutes à 4° C, puis pendant 30 minutes à la température ambiante. L'ADN de la réaction amorcée par l'oligonucléotide est utilisé pour transférer *E. coli* JM103 selon le processus de BRL, «Manuel de l'utilisateur/M13mp7 Cloning/Dideoxy Sequencing» (1980). Les plaques obtenues de cette façon sont piquées à des plaques YT [J.H. Miller, «Experiments in Molecular Genetics», p. 433, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)]. Les colonies obtenues sont hybridées à 55° C pendant 2 heures avec E3-4 marqué ^{32}p . Pour cette étape, le délétère est utilisé comme échantillon pour identifier les séquences de l'ADN ayant la séquence de bases complémentaire correspondante après avoir laissé l'intron. Les phages sont isolés de ces colonies qui s'hybrident avec le délétère.

Les phages résultants sont mis en plaques et celles-ci sont piquées à des plaques YT. On laisse les clones s'hybrider à 55° C

pendant 2 heures avec E3-4 marqué ^{32}p . Les clones positifs sont obtenus et l'ADN phage est mis en séquence pour choisir les phages où l'intron 3 est totalement laissé. Un tel phage est désigné par mp9-HGE Δ 3-1.

Etape 17: Construction de pHFNT-lacUV5-2

La forme répliquative de mp9-HGE Δ 3-1 est digérée avec *EcoRI*. Le fragment d'*EcoRI* est isolé et cloné à pBR327 scindé par *EcoRI* pour donner le plasmide pHGE Δ 3-1.

La construction d'un autre plasmide est effectuée en utilisant le plasmide pHGE Δ 3-1 afin d'obtenir un tel plasmide Δ 3-1 pouvant exprimer directement le FNT dans *E. coli* en utilisant *lac UV5* comme promoteur. Les processus sont illustrés à titre d'exemples à la figure 7. D'abord, 10 μg du plasmide pHGE Δ 3-1 sont digérés avec 10 unités d'*AvaI* et *EcoRI* (fabriqués et vendus par BRL, Inc., USA) à 37° C pendant 2 heures et subissent une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 4% en poids pour isoler les fragments. On isole du gel, par électroélution, environ 1 μg du fragment. De la même façon qu'à l'étape 14, deux oligodésoxynucléotides montrés à la figure 7, c'est-à-dire 5'-AATTCATGTCATCTTCTCGAACC-3' et 5'-TCGGGGTTCGAGAAGATGACATG-3', sont synthétisés. Alors, chaque extrémité 5' des deux oligodésoxynucléotides (environ 100 pmol) est phosphorylée en utilisant la polynucléotide kinase T_4 selon la méthode décrite dans la littérature N° 3, p. 122. Après accomplissement de la réaction, le mélange réactionnel est extrait avec du phénol, puis avec du chloroforme. Alors, les oligomères de synthèse ainsi obtenus sont mélangés avec 0,5 μg du fragment précédemment obtenu d'*AvaI-EcoRI* du plasmide pHGE Δ 3-1 et précipités dans l'éthanol. Ces fragments sont liés à 4° C pendant une nuit en utilisant 10 unités de ligase T_4 selon le processus décrit dans la littérature N° 1, p. 37. Après accomplissement de la réaction, le mélange est précipité dans l'éthanol, avec ensuite électrophorèse effectuée sur un gel de polyacrylamide à 4% en poids pour récupérer le fragment par électroélution.

Selon le processus décrit dans F. Fuller, «Gene», 19, pp. 42-54 (1982), on prépare le plasmide pOP95-15.

1 μg de pOP95-15 est digéré avec *EcoRI* et extrait avec du phénol, puis avec du chloroforme, avec ensuite précipitation dans l'éthanol pour obtenir un vecteur. En utilisant l'ADN T_4 ligase, 0,5 μg du vecteur obtenu est lié au fragment ci-dessus obtenu. Selon le processus décrit dans la littérature N° 4, p. 20, on transforme *E. coli* JM101 (ATCC33876) en utilisant le vecteur ci-dessus obtenu, puis on met en culture sur un milieu d'agar contenant 1mM d'IPTG et 0,004 poids/volume % de X-gal pour obtenir environ 100 colonies blanches.

L'ADN plasmidique est préparé à partir de ces transformants et est digéré avec *EcoRI* pour identifier les plasmides contenant le fragment voulu d'*EcoRI*. Afin d'examiner la direction de l'insertion, ces plasmides sont digérés avec *PvuII* et *PstI* et subissent une électrophorèse sur un gel agarose à 1,5% en poids pour choisir les plasmides donnant des fragments d'environ 1280 bp et environ 2600 bp indiquant que la direction de transcription du promoteur *lac UV5* est en accord avec celle des oligodésoxynucléotides codant le FNT.

L'analyse de la séquence de bases montre que ces deux plasmides ont la même séquence et que le promoteur *lac UV5*, l'oligodésoxynucléotide synthétisé et l'ADN sont bien combinés les uns avec les autres. Le plasmide obtenu est désigné par pHFNT-lacUV5-2.

On met *E. coli* contenant pHFNT-lacUV5-2 en culture dans un milieu nutritif conventionnel. La biodétermination du produit pour l'activité du FNT indique presque la même activité que l'on obtient avec un plasmide pFNT-lacUV5-1 contenant le gène de FNT du lapin sous le contrôle du promoteur *lac*.

Exemple 2

En utilisant le plasmide pHGE et les oligodésoxynucléotides 1 à 4 obtenus par le processus décrit aux étapes 1 à 14 de l'exemple 1,

on prépare pHFNT-lacUV5-1 selon le processus illustré à la figure 6.

Les micro-organismes et les nouveaux plasmides ont été placés en dépôt à l'American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20862, USA, le 6 avril 1984 en déposant des échantillons des micro-organismes contenant les plasmides. La souche JM83 (pRGE) du micro-organisme *E. coli* K-12 a reçu le numéro d'accèsion ATCC39655. La souche JM83 (pHGE) du

micro-organisme *E. coli* K-12 a reçu le numéro d'accèsion ATCC39656.

L'invention ayant été ainsi décrite, il sera évident qu'elle peut être modifiée de nombreuses façons. De telles variations ne doivent pas être considérées comme s'écartant du cadre et de l'esprit de l'invention et toutes les modifications évidentes à toute personne compétente en la matière sont incorporées dans le cadre de celle-ci.

FIG. I

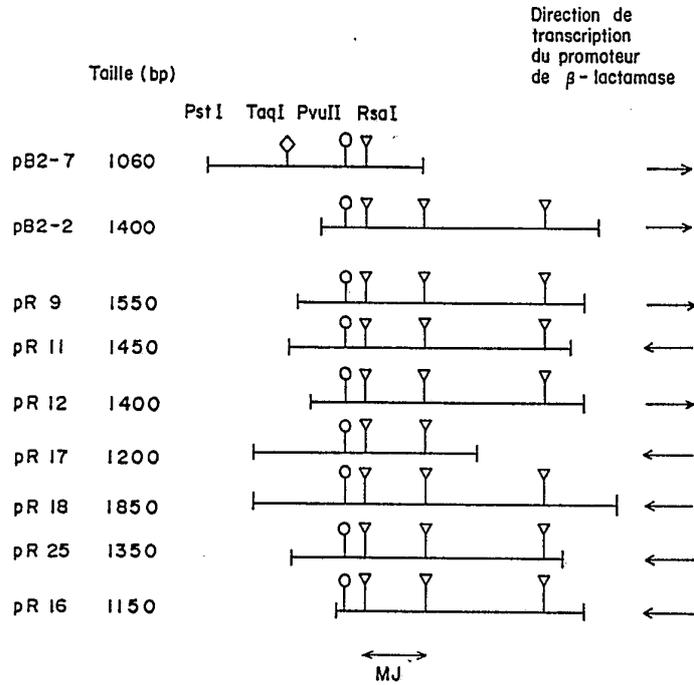


FIG. 2

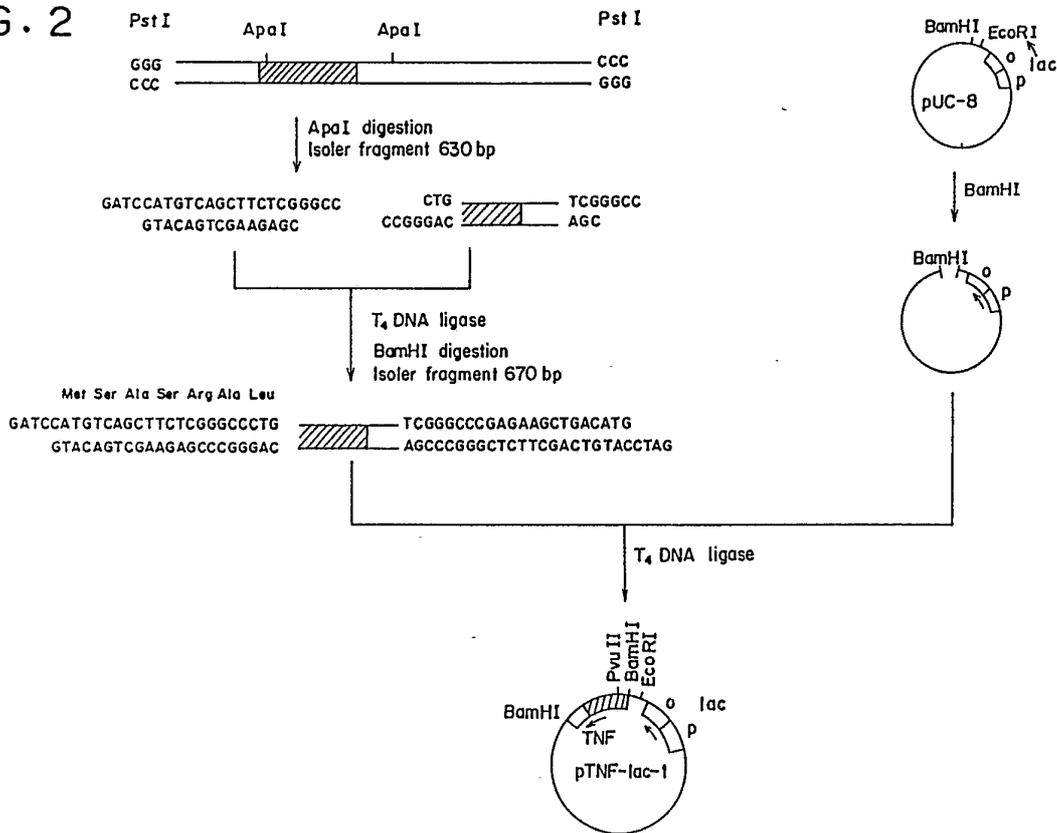


FIG. 3

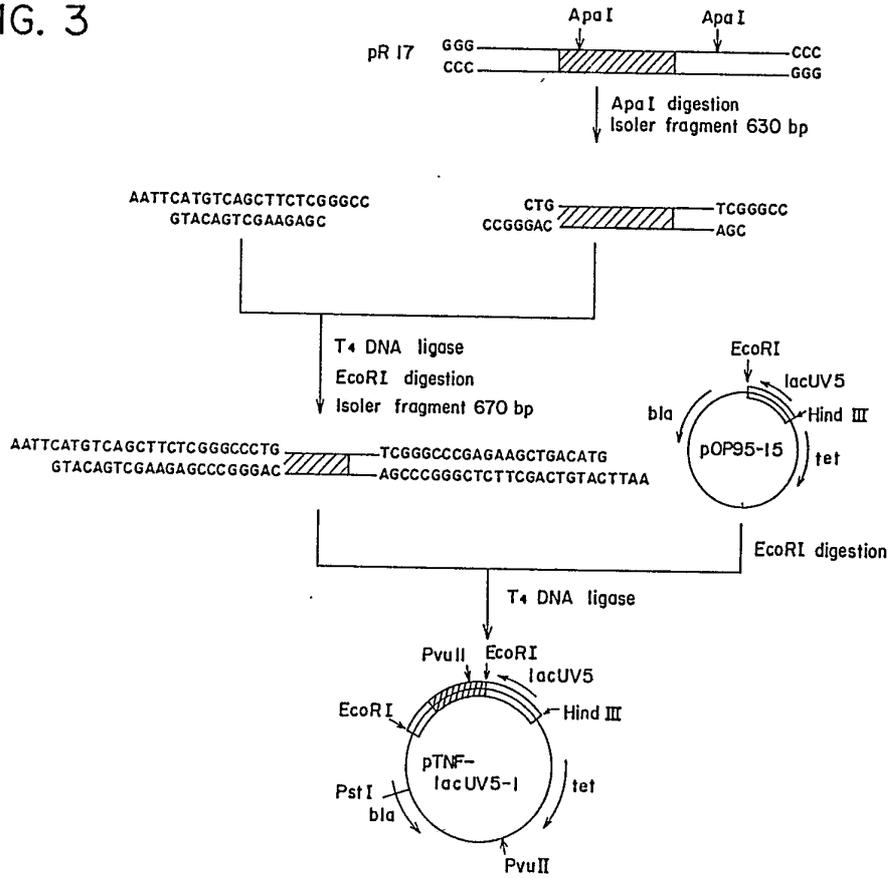


FIG. 7

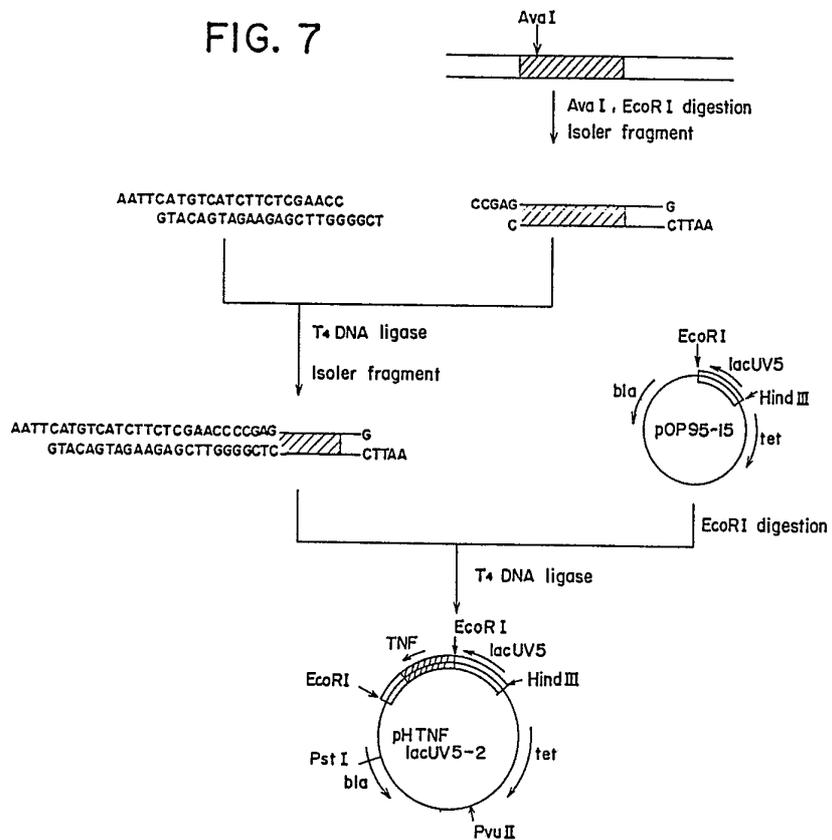


FIG. 4

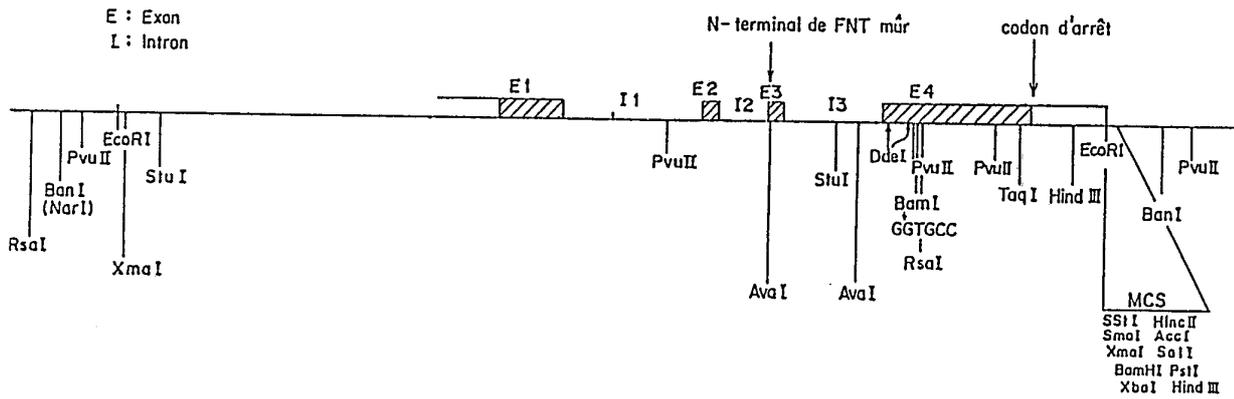


FIG. 5

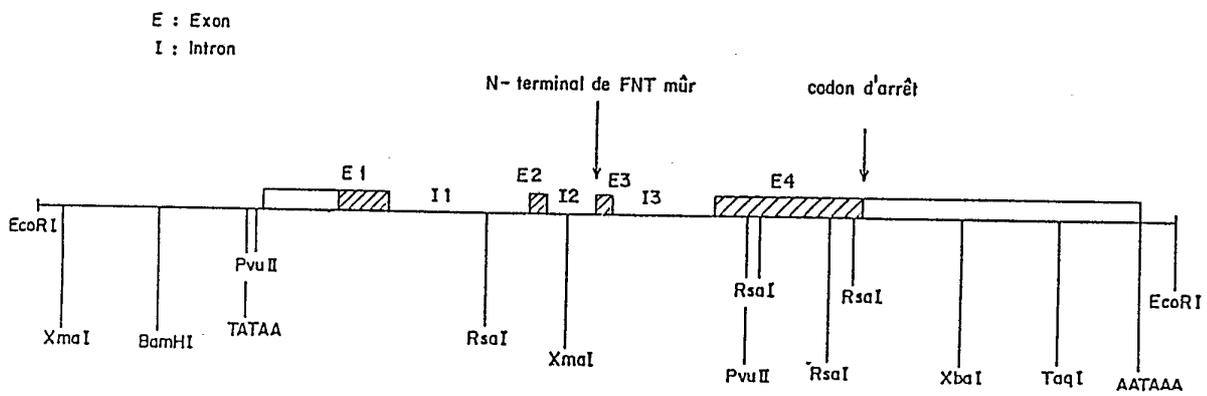


FIG. 6

