



Office de la propriété
intellectuelle
du Canada

organisme
industrie Canada

www.opic.gc.ca

Canadian
Intellectual Property
Office

An Agency of
Industry Canada

www.cipo.gc.ca

(11) (C) **1,341,490**

(21) 541,712

(22) 1987/07/09

(45) 2005/08/30

(52) 195 - 1.19
RENOI 195 - 1.37

(51) Int.Cl. ⁷ C12N 15/12; C12N 15/81; C12N 1/19; C12P 21/02

(19) (CA) **BREVET CANADIAN** (12)

(54) Bloc fonctionnel d'ADN et plasmide codant pour l'hirudine, levure transformée, procédé de préparation de l'hirudine, hirudine obtenue et son utilisation pharmaceutique

(72) LOISON, GERARD, FRANCE
LEMOINE, YVES, FRANCE
LABAT, NATHALIE, FRANCE
BALLAND, ALAIN, FRANCE

(73) SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT GERMANY

(30) (FR) FRANCE 86 10090 1986/07/10
(FR) FRANCE 86 16722 1986/12/01

(57) 9 Claims

541,712

BLOC FONCTIONNEL D'ADN ET PLASMIDE CODANT POUR
L'HIRUDINE, LEVURE TRANSFORMEE, PROCEDE DE PREPARATION
DE L'HIRUDINE, HIRUDINE OBTENUE ET SON
UTILISATION PHARMACEUTIQUE

TRANSGENE S.A.

ABREGE DESCRIPTIF

L'invention concerne un bloc fonctionnel d'ADN permettant la préparation de l'hirudine à partir de levure, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence :

- S_{tr} - L_{ex} - S_{cl} - gène H
- . gène H étant le gène de l'hirudine ou l'un de ses variants,
- . S_{tr} est une séquence d'ADN comportant les signaux assurant la transcription du gène H par la levure,
- . L_{ex} est une séquence "leader" nécessaire pour obtenir l'excrétion du produit du gène,
- . S_{cl} est une séquence d'ADN codant pour le site de clivage par la protéinase ycsF, site de clivage qui est unique et situé dans le précurseur de l'hirudine immédiatement en amont du gène H.

L'invention concerne plus particulièrement un bloc fonctionnel d'ADN dans lequel le gène H code pour HV1.

La présente demande concerne des perfectionnements apportés à la demande de brevet internationale WO 86/06406 publiée le 6. Novembre, 1986.

Elle concerne des vecteurs d'expression d'une protéine ayant l'activité de l'hirudine de sangsue (*H. medicinalis*).

5 La demande de brevet WO 86/06406 décrit un procédé permettant de faire produire par des levures telles que *S. cerevisiae* de l'hirudine sécrétée dans le milieu de culture sous forme active.

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs qui assurent la production de l'hirudine, notamment HV1, dans de meilleures conditions.

10 Plus particulièrement, la présente invention concerne des blocs fonctionnels d'ADN permettant la préparation de l'hirudine à partir de levures, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins la séquence :

15 - S_{tr} - L_{ex} - S_{cl} - gène H

. gène H étant le gène codant pour l'hirudine ou l'un de ses variants ; le gène H est, de préférence, selon la présente invention le gène codant pour HV1 ou HV2 ; éventuellement, le gène H peut être suivi d'une séquence de terminateur de levure, par exemple celui du gène PGK ;

20 . S_{tr} est une séquence d'ADN comportant les signaux assurant la transcription du gène H par la levure ;

. L_{ex} est une séquence leader nécessaire pour obtenir l'excrétion du produit du gène ;

25 . S_{cl} est une séquence d'ADN codant pour le site de clivage par la protéinase yscF, site de clivage qui est unique et situé dans le précurseur de l'hirudine immédiatement en amont du gène H ; en outre, l'élément S_{cl} - gène H peut être répété plusieurs fois.

30 Ce type de bloc d'expression permet d'obtenir une protéine unique, mature et correcte.

En effet, avec la construction décrite dans la demande de brevet WO 86/06406, *S. cerevisiae* produit l'hirudine sous forme d'un précurseur présentant deux sites de coupure pour la protéinase yscF, produit du gène

KEX2, (1). L'activité endo-peptidase de yscF est nécessaire à la maturation de ce précurseur de l'hirudine . Cependant, seuls les évènements de coupure au deuxième site, celui le plus éloigné de l'extrémité NH_2 du précurseur, permet la libération de l'hirudine active ; par contre, lorsque la coupure a lieu au premier site et non au deuxième, c'est une forme plus longue qui est sécrétée et qui diffère de l'hirudine par une extension de résidus aminoacides à l'extrémité NH_2 . Cette dernière forme non désirable peut contaminer l'hirudine mature et correcte au cours de différentes étapes de purification et de ce fait compliquer le procédé de purification et entraîner une baisse de rendement dans la préparation d'hirudine pure.

Par la présente invention, on fait synthétiser à la levure un précurseur de l'hirudine qui ne possède qu'un seul site de coupure pour yscF de façon à ce que sa maturation en hirudine ne conduise à sécréter que la forme recherchée.

Parmi les séquences L_{ex} , il faut citer en particulier la séquence dite "pre-pro" qui permet l'excrétion de la phéromone sexuelle alpha de levure.

On a choisi comme exemple de système de sécrétion, celui de la phéromone alpha, c'est-à-dire que, dans la séquence précédente, la séquence L_{ex} provient du gène de la phéromone sexuelle alpha de levure, mais d'autres systèmes pourraient être utilisés (par exemple le système de la protéine Killer) (4).

De façon préférentielle, il est intéressant que les levures hôtes des plasmides portant les blocs fonctionnels selon l'invention puissent être d'un type sexuel quelconque et puissent, en outre, être cultivées en absence de une pression de sélection.

Dans ces conditions, les levures transformées peuvent être mises en oeuvre au stade industriel de façon particulièrement commode.

Pour ce faire, la présente invention propose des blocs d'expression d'ADN tels que décrits précédemment mais dans lesquels la séquence S_{tr} comporte un promoteur d'un gène de levure différent du promoteur du gène MFalpha1, il peut s'agir, par exemple, du promoteur du gène PGK de la levure.

En effet, dans les constructions décrites dans la demande de brevet WO 86/06406, le gène du précurseur de l'hirudine est transcrit à partir du promoteur du gène MFalpha1. Ce promoteur fonctionne au maximum de sa puissance dans les souches de type sexuel Matalpha. Le choix de l'hôte se restreint donc à ce type de souche, ce qui exclut les souches de type sexuel Mata ainsi que celles diploïdes ou polyploïdes dépourvues de type sexuel. En particulier, cela exclut les souches de levure utilisées dans l'industrie qui rentrent le plus souvent dans cette dernière catégorie. En changeant de promoteur, on peut obtenir une expression de l'hirudine indépendante du signe sexuel de la souche hôte.

De façon générale, ces blocs d'ADN seront portés par des plasmides comportant, en outre, une origine de répllication dans les levures, par exemple l'origine de répllication du plasmide 2μ.

Pour faciliter la construction des vecteurs, ces plasmides pourront être des "navettes coli-levure" et comporter des éléments qui permettent leur répllication dans E. coli, par exemple une origine de répllication telle que celle de pBR322 et un marqueur de sélection comme amp^R. Ces plasmides comporteront également un marqueur de sélection pour la levure, par exemple un gène codant pour la résistance à certains composés chimiques toxiques ou un gène permettant de compléter une auxotrophie ; on utilisera plus particulièrement le gène URA3.

En effet, on a montré dans la demande de brevet internationale WO 86/01224 publié le 27. février, 1986 que l'introduction de certaines mutations conférant la résistance au 5-FU dans une souche ura3 transformée en ura+ par le biais d'un plasmide permettait un plus grand choix de milieux pour la culture de ces souches transformées ; on pourrait en particulier utiliser les milieux complexes industriels.

La présente invention concerne plus particulièrement la synthèse et la sécrétion du variant HV1.

Le gène HV1 a déjà été synthétisé chimiquement en vue de son expression dans E. coli (brevet français n° 84 13250 de Transgene S.A. publié le 28. février, 1986 sous le nombre 2,569,420).

La plupart des oligonucléotides synthétiques utilisés dans le brevet n° 13250 ont été conservés pour la construction de la séquence

codant pour le précurseur d'HV1, à l'exception de ceux qui permettent les différentes jonctions avec les séquences qui seront fusionnées en amont et en aval de la séquence.

5 L'obtention d'une hirudine sécrétée nécessite la présence d'un précurseur contenant les informations nécessaires à la sécrétion et à la maturation correcte de ce polypeptide suivant le chemin métabolique normal de la levure. Dans la demande de brevet WO 86/06406, on a montré que la séquence NH_2 -terminale du précurseur du facteur alpha pouvait être utilisée pour la sécrétion du variant HV2 de l'hirudine. La présente
10 invention concerne l'application de ce système à la sécrétion du variant HV1.

L'invention concerne en particulier un bloc fonctionnel d'ADN permettant la préparation de l'hirudine à partir de levure, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

- 15 . le gène de HV1 ;
 . une séquence d'ADN (S_{tr}) comportant les signaux assurant la transcription du gène de HV1 par la levure.

Ce bloc fonctionnel, intégré dans un plasmide ou dans les chromosomes d'une levure, de préférence du genre Saccharomyces, pourra
20 permettre, après transformation de ladite levure, l'expression de l'hirudine, soit sous forme active, soit sous forme d'un précurseur inactif, pouvant régénérer l'hirudine par activation.

Ces blocs fonctionnels présentent, de préférence la structure suivante :

- 25 - S_{tr} - L_{ex} - S_{cl} - gène H -

 . gène H étant le gène codant pour HV1 ; le gène H est, le cas échéant, suivi d'une séquence de terminateur de levure telle que celle du
30 gène PGK ;

 . S_{tr} est une séquence d'ADN comportant les signaux assurant la transcription du gène H par la levure ;

 . L_{ex} est une séquence leader nécessaire pour obtenir l'excrétion du produit du gène ;

. S_{cl} est une séquence d'ADN codant pour un site de clivage comportant, le cas échéant, à l'extrémité 3', avant le gène H, un codon ATG ou deux codons codant pour Lys-Arg ou cinq codons codant pour Ser-Leu-Asp-Lys-Arg ;

5 . en outre, l'élément S_{cl} -gène H peut être répété plusieurs fois.

Parmi les séquences L_{ex} , il faut citer celle de la phéromone sexuelle alpha de levure, et pour S_{tr} , il faut citer le promoteur du gène MFalpha1 et également le promoteur du gène PGK, mais d'autres séquences peuvent être utilisées, en particulier on a choisi comme exemple de
10 système de sécrétion celui de la phéromone alpha, c'est-à-dire que, dans la séquence précédente, la séquence L_{ex} provient du gène de la phéromone sexuelle alpha de levure, mais d'autres systèmes pourraient être utilisés (par exemple le système de la protéine Killer) (4).

Pour diriger l'expression et la sécrétion de l'hirudine dans le
15 milieu de culture, le gène correspondant est intégré dans un vecteur de levure ou un plasmide qui comprend le bloc fonctionnel décrit ci-dessus et au moins une origine de répllication dans les levures. Le plasmide comporte de préférence les éléments suivants :

- . l'origine de répllication du plasmide de levure 2μ ,
- 20 . le gène *ura3*,
- . une origine de répllication dans *E. coli* et un marqueur de résistance à un antibiotique,
- . la région 5' du gène MFalpha1 qui comprend le promoteur de transcription, la séquence "leader" et la séquence pre-pro du précurseur du facteur
25 alpha, cette séquence sera fusionnée, en phase, en amont de la séquence codante de l'hirudine HV1,
- . le terminateur de transcription du gène PGK de la levure qui sera placé en aval du gène de l'hirudine.

De façon générale, les blocs d'expression selon l'invention
30 pourront être intégrés dans une levure, en particulier *Saccharomyces*, soit dans un plasmide à répllication autonome, soit dans le chromosome de la levure.

1 3 4 1 4 9 0

Lorsque le plasmide est autonome, il comportera des éléments assurant sa réplication, c'est-à-dire une origine de réplication telle que celle du plasmide 2 μ . En outre, le plasmide pourra comporter des éléments de sélection tels que le gène URA3 ou LEU2 qui assurent la complémentation de levures $ura3^-$ ou $leu2^-$. Ces plasmides peuvent également comporter des éléments assurant leur réplication dans les bactéries, lorsque le plasmide doit être un plasmide "navette", par exemple une origine de réplication telle que celle de pBR322, un gène marqueur tel que Amp^r et/ou d'autres éléments connus de l'homme de métier.

La présente invention concerne également les levures transformées par un bloc d'expression selon l'invention, soit porté par un plasmide, soit intégré dans ses chromosomes, en particulier les souches de Saccharomyces et spécialement les souches de S. cerevisiae notamment de type sexuel Mata ou bien les souches diploïdes ou polyploïdes dépourvues de type sexuel, mais surtout les souches de levure ura^- transformées ura^+ par un plasmide selon l'invention et devenues résistantes au 5-fluorouracile, ces souches pouvant être cultivées sur milieu industriel.

Lorsque le promoteur est celui du gène de la phéromone alpha, la levure sera de préférence de type sexuel Mataalpha. On utilisera, par exemple, une souche de génotype $ura3^-$ ou $leu2^-$ ou autre, complémenté par le plasmide pour assurer le maintien du plasmide dans la levure par une pression de sélection appropriée.

Enfin, la présente invention concerne un procédé de préparation d'hirudine ou de l'un de ses variants par fermentation d'une levure transformée telle que décrite précédemment sur un milieu de culture et récupération de l'hirudine produite dans le milieu de culture sous forme mature ou sous forme d'un précurseur de l'hirudine maturable in vitro ou in vivo, ainsi que l'hirudine ou ses variants obtenus par ce procédé.

Ainsi, bien qu'il soit possible de préparer l'hirudine par fermentation des souches transformées précédentes sur un milieu de culture adapté, par accumulation d'hirudine dans les cellules, il est néanmoins préféré de faire sécréter l'hirudine dans le milieu, soit sous forme mature, soit sous forme d'un précurseur qui devra être processé in vitro.

Cette maturation peut se faire en plusieurs étapes. Tout d'abord, il peut être nécessaire de cliver certains éléments provenant de la traduction de la séquence L_{ex} , ce clivage sera effectué au niveau de la séquence correspondant à S_{cl} . L'hirudine mature peut être précédée d'une méthionine qui sera coupée sélectivement par le bromure de cyanogène. Ce procédé est utilisable parce que la séquence codante de l'hirudine ne comprend pas de méthionine.

Il est également possible de prévoir à l'extrémité N le dipeptide Lys-Arg qui est coupé en COOH par une endopeptidase spécifique ; cette enzyme étant active dans le processus de sécrétion, on peut donc obtenir ainsi directement la protéine mature dans le milieu. Mais, dans certains cas, il peut être nécessaire de prévoir un clivage enzymatique après sécrétion en ajoutant une enzyme spécifique.

Dans certains cas, en particulier après un traitement au bromure de cyanogène, il peut être nécessaire de renaturer la protéine en recréant les ponts disulfures. Pour ce faire, le peptide est dénaturé, par exemple au chlorhydrate de guanidinium, puis renaturé en présence de glutathion réduit et oxydé.

Enfin, l'invention concerne l'hirudine obtenue par les procédés selon l'invention.

L'hirudine ainsi obtenue peut être utilisée à titre d'inhibiteur de la thrombine, comme médicament anticoagulant, comme produit de laboratoire pour empêcher la coagulation et/ou comme agent de diagnostic en utilisant le produit marqué.

En particulier, l'HVI peut être utilisée dans des compositions pharmaceutiques, seule ou en combinaison avec d'autres principes actifs, ou bien dans le cadre de tests ou de diagnostic, in vitro ou in vivo. Dans ce dernier cas, il peut être intéressant de marquer la molécule, par exemple par un marquage radioactif, fluorescent, enzymatique ou autre.

Les exemples suivants illustreront d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

Sur les figures ci-annexées :

1 3 4 1 4 9 0

. la figure 1 représente la construction et la structure de M13TG897,
 . la figure 2 représente la mutagenèse in vitro de l'ADN phagique de M13TG897 en M13TG1827 :

- 5 a) séquence de l'oligonucléotide de la mutagenèse,
 b) séquence partielle de l'ADN de M13TG897 s'hybridant à l'oligonucléotide,
 c) séquence mutée,

- . la figure 3 représente la construction de pTG883,
 . la figure 4 représente la construction de pTG892,
 10 . la figure 5 représente la construction de M13TG889,
 . la figure 6 représente la structure de pTG1828 et pTG1833,
 . la figure 7 représente la structure du précurseur de l'hirudine correspondant aux séquences portées par différents plasmides ; on a représenté la jonction entre a) le site de clivage (lys arg) le plus proche de l'extrémité
 15 NH_2 du précurseur et b) la séquence mature de l'hirudine HV2 (NH_2 -Ile-Thr etc.).
 . la figure 8 représente les séquences et la position des oligonucléotides utilisés pour la synthèse de la séquence d'ADN codant pour HV1,
 . les figures 9 et 10 représentent la carte de restriction et la traduction de
 20 la séquence en amino-acides lors de la synthèse de la séquence d'ADN codant pour HV1.

Les plasmides et stratégies utilisés et décrits dans la demande de brevet WO 86/06406 ne sont pas repris dans la présente demande.

25 EXEMPLE 1

Le plasmide pTG897 porte l'information pour un précurseur de l'hirudine qui ne contient qu'un seul site de clivage pour la protéinase yscF. La maturation à ce site de clivage libère une hirudine inactive. La coupure par la protéinase yscF libère une molécule d'hirudine allongée en NH_2 par
 30 4 résidus Glu Ala Glu Ala. La délétion du fragment d'ADN codant pour cette séquence Glu Ala Glu Ala permettrait de libérer une chaîne d'hirudine correctement processée. Cette délétion a été réalisée par la technique de mutagenèse dirigée in vitro.

1341490

Le plasmide pTG897 a été découpé par double digestions PstI-BglII ; le fragment d'ADN comprenant la séquence de l'hirudine a été cloné dans la forme répliquative du phage simple brin M13TG131 pour donner le phage M13TG897 (figure 1).

5 On a hybridé un oligonucléotide de séquence :

5'-TCTTTGGATAAAAGAATTACGTATACAGAC-3'

10 à l'ADN génomique de ce phage M13TG897. Cet oligonucléotide s'hybride dans sa première moitié (15 paires de bases) avec la séquence de 15 paires de bases directement en amont de la séquence à déléter et dans sa seconde moitié avec la séquence de 15 paires de bases directement en aval (figure 2). Cet oligonucléotide a servi comme matrice pour la synthèse in vitro du brin complémentaire du génome du phage M13TG897. Après action de la T4
15 ADN ligase destinée à refermer de façon covalente le brin nouvellement formé, on transfecte une bactérie réceptrice, par exemple JM103 (Δ (Lac-Pro) SupE Thi EndIA sbcB15 strA rk- mk+/F' TraD36 ProAB+ LacI^Q LacZ Δ M15) et on analyse les phages issus de cette transfection par hybridation ADN-ADN en utilisant comme sonde l'oligonucléotide décrit
20 précédemment et marqué au ^{32}P par kination, suivant les techniques habituelles pratiquées par l'homme de l'art (2). Cet ADN phagique correctement muté forme avec l'oligonucléotide de la mutagenèse un complexe d'hybridation repérable par sa plus grande stabilité, sa plus grande résistance aux conditions de stringence alors que le complexe
25 d'hybridation formé par l'ADN phagique non muté et l'oligonucléotide est déstabilisé par la présence d'une boucle d'ADN simple brin.

EXEMPLE 2

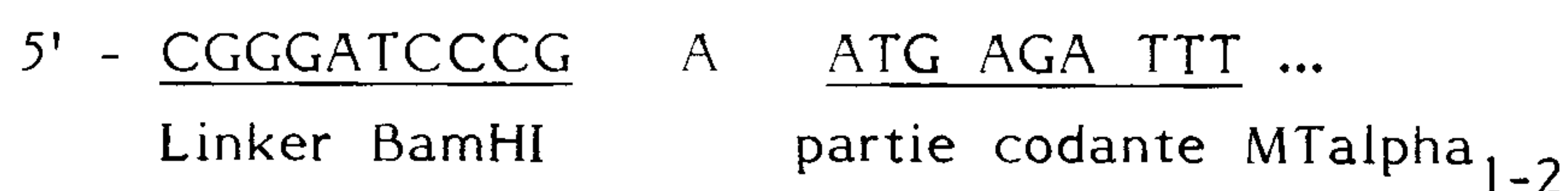
Transfert du fragment muté dans un nouveau vecteur d'expression

30 Le plasmide pTG883 dérive du plasmide pTG876 par simple suppression du site BglII se trouvant près du terminateur de transcription du gène PGK.

1341490

Pour ce faire, on a digéré partiellement ce plasmide pTG876 par BglII, puis on a fait agir le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de E. coli en présence des 4 nucléotides et on a lié covalamment les molécules d'ADN sur elles-mêmes grâce à l'action de l'ADN ligase du phage T4. Le plasmide pTG883 ne possède plus qu'un seul site BglII, situé en amont du promoteur du gène de la phéromone (figure 3).

Le plasmide pTG883 (20 µg) a été linéarisé par digestion BglII puis soumis à une digestion ménagée par la nucléase Bal31 (1.4 unités, 10 minutes - Boehringer Mannheim) suivant les techniques habituelles. L'ADN ainsi traité a été purifié par extractions successives au phénol et chloroforme - alcool isoamylique, puis une fraction (5 µg) a été soumise à l'action de la polymérase Klenow afin d'obtenir un maximum d'extrémités franches. L'ADN ainsi traité a été mis à liguer avec des linkers BamHI non phosphorylés (5'-CGGATCCCG) en présence de la ligase du phage T4 suivant la technique décrite par Lathe et al. (3). Après transformation de E. coli 1106 et sélection pour la résistance à l'ampicilline, on a isolé un plasmide pTG892 délété pour la région 5' flanquant le gène MFalpha1 (figure 4), le linker BamHI étant localisé une base en amont de l'ATG suivant le schéma :



Le nouveau fragment BamHI-SalI ainsi obtenu a été cloné entre les sites BamHI-SalI du phage M13TG120 pour donner le phage M13TG889 (figure 4). A partir du phage M13TG889, le fragment BamHI-BglII contenant toute la partie codante de la phéromone alpha a été isolé pour être ligué avec le grand fragment BglII du plasmide pTG848. Le plasmide obtenu après ligation, pTG892b, contient le fragment BamHI-BglII correspondant à la partie codante de la phéromone insérée derrière le site BglII du promoteur du gène PGK.

L'ADN de pTG892b comprend un site unique BglII, un site unique SalI, les deux sites encadrent une courte séquence comprenant un site PstI.

Par double digestion BglII et Sall, élution du grand fragment et ligation avec un polylinker synthétique, on a remplacé la courte séquence par le polylinker synthétique. Ce polylinker de séquence :

5' -GATCCAGCTGACATCTGCATGCG
GTCGACTGTAGACGTACGCAGCT-5'

présente une extrémité cohésive avec les fragments libérés par BglII, une extrémité cohésive avec les fragments libérés par Sall, ainsi que des sites de reconnaissance pour, entre autres, les enzymes PvuI, BglII et SphI.

Le nouveau vecteur ainsi obtenu a été appelé pTG1819. L'ADN de ce vecteur a été digéré par les enzymes SphI et PstI. Par cette double digestion, on obtient trois fragments : un PstI-PstI de 6,5 kb, un PstI-SphI de 1,9 kb et un autre SphI-PstI de 0,5 kb

Les deux fragments les plus longs ont été purifiés et mélangés avec le fragment SphI-PstI correspondant à l'hirudine mutée et provenant du phage M13TG1827, on a ainsi obtenu un nouveau vecteur d'expression : pTG1828 (figure 6).

20 EXEMPLE 3

Transfert du fragment dans le vecteur pTG881 : nouveau plasmide pTG1833

L'ADN de pTG881 a été partiellement digéré par PstI, de façon à libérer un fragment de 6,1 kb. Ce fragment a été isolé puis digéré totalement par BglII, ce qui libère 2 fragments PstI-PstI et PstI-BglII. Ces deux fragments ont été ligués avec le fragment PstI-BglII de 0,62 kb issu de pTG1828. On reconstitue ainsi un nouveau vecteur pTG1833 qui ne diffère du plasmide pTG897 que par la délétion des séquences codant pour Glu Ala Glu Ala. La structure du précurseur ainsi formé est présentée sur la figure 7. Ce plasmide pTG1833 possède une origine de réplication pour E. coli, un gène de résistance à l'ampicilline, le gène Leu2 de S. cerevisiae, un fragment du plasmide 2μ qui permet la réplication dans S. cerevisiae, le promoteur du gène MFalpha₁ codant pour pré-pro et le gène de l'hirudine (figure 6).

1341490

EXEMPLE 4Transformation de la levure par les plasmides pTG1828 et pTG1833

On a transformé la souche S. cerevisiae TGY1sp4
 5 (Matalpha ura3-251-373-328 his3-11-15) par les plasmides pTG1818, pTG1828 et pTG1833. Les résultats reportés dans le tableau 1 indiquent que pTG1818 et pTG1833 provoquent la sécrétion d'un même niveau d'activité hirudine. Par contre, TGY1sp4 pTG1828 sécrète deux fois moins d'activité hirudine que les deux autres souches. Comme contrôle, on a inclus une
 10 souche TGY1sp4 pTG881 qui ne possède pas l'information génétique pour l'hirudine. On a également comparé la production d'hirudine sécrétée par les souches de S. cerevisiae (Mat a) TGY14-1 transformée soit par pTG1828 soit par pTG1833 et TGY14-2 transformée par les mêmes plasmides (tableau 2). Là encore, on remarque
 15 que dans le cas de la souche TGY14-2 (type sexuel Matalpha), le plasmide pTG1833 induit une meilleure sécrétion d'hirudine que le plasmide pTG1828. Par contre, dans le cas de la souche TGY14-1 (type sexuel Mat a) pTG1833 n'induit pas de sécrétion d'hirudine, comme attendu, alors que TGY14-2 produit l'hirudine.

20

TABLEAU 1

Activité antithrombine des surnageants de cultures de levure (10 ml)
(48 h de culture, milieu YNBG et casaminoacides 0,5 %)

25

<u>Réceptrice</u>	<u>Plasmide</u>	<u>Activité totale</u>
TGY1sp4	pTG881	non détectable
	pTG1818	158
	pTG1828	73
	pTG1833	149

30

TABLEAU 2

5 Activité antithrombine des surnageants de culture de levure (10 ml)
 (72 h de culture, milieu YNBG + casaminoacides 0,5 %)

	<u>Réceptrice</u>	<u>Plasmide</u>	<u>Activité totale</u>
10	TGY14-1	pTG881	non détectable
		pTG1828	54
		pTG1833	non détectable
15	TGY14-2	pTG881	non détectable
		pTG1828	103
		pTG1833	210

EXEMPLE 5

Isolement de souches pouvant être cultivées en milieu complet
sans que le phénotype plasmidique soit perdu

20 On a montré dans le brevet WO 86/01224 que l'introduction de
certaines mutations conférant la résistance au 5-FU dans une souche ura3
transformée en ura+ par le biais d'un plasmide permettait un plus grand
choix de milieux pour la culture de ces souches transformées ; on pourrait
en particulier utiliser les milieux complexes industriels. A partir de la
25 souche TGY1sp4 pTG1833 on a isolé des mutants spontanés capables de
former des colonies sur milieu complet (YPG) supplémenté avec du
5-Fluorouracile 1 mg/ml suivant le protocole décrit dans le brevet
WO 86/01224. 6 mutants ont été cultivés en milieu complet et on en a
choisi un qui ne présentait aucune colonie guérie pour le plasmide après
30 plus de 20 générations de croissance en conditions non sélectives.

Le mutant, appelé TGY1sp4-3, peut être utilisé pour la
production d'hirudine en milieu complet.

1 3 4 1 4 9 0

EXEMPLE 6Stratégie de synthèse de la séquence d'ADN codant pour HVI

5 Cette séquence devra porter les éléments permettant la fusion en phase de la séquence d'HVI avec la partie pre-pro de MF α 1 et les signaux permettant une maturation correcte de l'hirudine sécrétée ; en particulier la région de jonction contiendra un doublet Lys-Arg juste en amont du premier résidu NH₂-terminal de HVI.

10 La stratégie utilisée est similaire à celle décrite dans le brevet français n° 84 13250 de Transgene S.A. publié le 28. février, 1986 sous le nombre 2,569,420. La synthèse se fait en deux blocs séparés qui sont ensuite assemblés grâce à leurs extrémités cohésives BamHI. Le premier bloc comprend 9 oligonucléotides numérotés de 1 à 9 et le second block comprend 10 nucléotides numérotés de 10 à 19. Leurs séquences et la position des oligonucléotides sont représentés à la figure 8.

15 La carte de restriction ainsi que la traduction de la séquence en acides sont données dans les figures 9 et 10.

EXEMPLE 7Assemblage du gène synthétique. Premier bloc synthétique

20 Les oligonucléotides 2 à 8 (figure 8) ont été phosphorylés à leurs extrémités 5' pour éviter la formation de dimères ou de polymères : 500 picomoles de chaque oligonucléotide ont été traitées à la polynucléotide kinase (2 unités) dans un volume final de 25 μ l de Tris HCl 60 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, dithiothreitol 8 mM, contenant 3,3 pmoles de gamma-ATP ³²P (5 000 Ci/nmole) ; après 15 minutes d'incubation à 37°C on ajoute 5 nmoles d'ATP non marqué.

30 Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, les fragments complémentaires ont été hybridés deux à deux, à l'exception des fragments 1, 2 et 3, ces derniers étant mélangés ensemble. 300 pmoles de chaque oligonucléotide ont été utilisés dans un volume final 10 μ l de Tris HCl 66 mM, pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, NaCl 100 mM, spermidine 0,5 mM, DTT 8 mM.

* MARQUE DE COMMERCE

Ces mélanges chauffés à 100°C pendant 3 minutes sont ensuite refroidis lentement à 37°C pendant 2 heures. Les oligonucléotides 1-2-3 hybridés ont été mélangés avec les oligonucléotides 4-5 et incubés à 37°C pendant 2 heures. De la même façon, on a procédé à l'hybridation des couples des oligonucléotides 6-7 avec 8-9. Dans une dernière étape, on a rassemblé les 9 oligonucléotides ainsi prétraités, que l'on a incubés 2 heures à 37°C dans un volume final de 100 µl.

14 pmoles de ces oligonucléotides hybridés ont été soumis à un traitement par la ligase de T4 pendant 15 heures à 15°C. Ensuite on a ajouté au mélange réactionnel 50 ng du grand fragment HindIII-BamHI du M13TG131 préalablement purifié sur gel. Le mélange de ligation a ensuite été utilisé pour transformer des cellules compétentes d'E. coli JM103. Parmi 12 clones phagiques ainsi obtenus, un seul présentait la séquence recherchée : M13TG1888.

. Deuxième bloc synthétique

On a utilisé la même stratégie pour synthétiser le second bloc (figure 8) qui a été cloné entre les sites BamHI et Sall du phage M13TG131. Deux clones sur les 12 testés ont présenté un insert correspondant à la séquence recherchée. Un de ces clones a été nommé M13TG1889.

. Assemblage du gène synthétique

Les deux ADN double-brin de M13TG1888 et de M13TG1889 ont été digérés par HindIII et BamHI et par BamHI et Sall respectivement, et mélangés avec le grand fragment HindIII-Sall de pBR322 purifié sur gel. Après ligation, le mélange a servi à transformer E. coli 1106. Par sélection pour la résistance à l'ampicilline on a obtenu le plasmide pTG1890 qui contient la séquence synthétique correctement reconstituée.

EXEMPLE 8

Construction du vecteur pTG1891 qui permet la sécrétion de l'hirudine synthétisée

Le fragment d'ADN de pTG1890 qui porte la séquence codante de HV1 est repris sous forme de fragment HindIII-BglII (le site BglII étant situé juste en amont du site Sall qui a servi au clonage précédent) pour être

inséré entre les sites HindIII et BglII du plasmide pTG881 décrit dans la demande de brevet WO 86/06406. Dans le plasmide résultant, pTG1891, le gène HV1 se retrouve donc inséré entre les séquences pre-pro de MFalpha1 et le terminateur de transcription ; cette construction doit donc assurer la maturation et la sécrétion de l'hirudine HV1 puisqu'elle est identique à pTG1818 (demande de brevet WO 86/06406) à l'exception des séquences codantes de HV2 qui sont remplacées par celles de HV1.

EXEMPLE 9

Transformation d'une souche TGY1sp4 par l'ADN du plasmide pTG1891

La souche TGY1sp4 (alpha-1 ura3-251-373-328, His3-11-15) a été transformée par le plasmide pTG1891 ; 2 clones obtenus par sélection pour le caractère ura⁺ ont été mis en culture et leur production d'hirudine, sécrétée dans le milieu de culture, a été déterminée. Comme contrôle, on a dosé dans les mêmes conditions la quantité d'hirudine sécrétée par TGY1sp4 pTG1818.

On mesure deux fois plus d'activité antithrombine dans le surnageant de culture de la souche TGY1sp4 pTG1891 (0,9 mg/l de surnageant de culture) que dans celui de la souche TGY1sp4 pTG1833.

Dépôt de souches représentatives de l'invention

Les souches suivantes ont été déposées à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cédex 15 :

* le 6 juin 1986 :

- . Saccharomyces cerevisiae TGY1sp4 pTG1828, sous le n° I-569
- . Saccharomyces cerevisiae TGY1sp4.3pTG1833, sous le n° I-570.

* le 6 novembre 1986 :

- . Saccharomyces cerevisiae TGY1sp4 pTG1891, sous le n° I-623

1341490REFERENCES

- 1) Achstetter, T. et Wolf, D.H. (1985) EMBO Journal 4, 173.
- 2) Zoller, M.J. et Smith M.H. (1983) Meths in Enzym. 100, 469.
- 5 3) Lathe, R. ; Kieny, M.P. ; Skory, S. et Lecocq J-P (1984)DNA 3, 173.
- 4) Bussey H., Saville D., Greene D. et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3,
1362-1370.

10

15

20

25

30

1 3 4 1 4 9 0**Revendications**

1. Bloc fonctionnel d'ADN permettant la préparation d'un variant d'hirudine (HV) à partir de levure, caractérisé en ce qu'il comporte:

5 un premier fragment d'ADN codant pour un précurseur d'un variant d'hirudine; le dit précurseur comporte le dit variant hirudine ainsi qu'une région additionnelle comportant plus que deux amino-acides reliée par une liaison peptidique à l'extrémité N-terminale du dit
10 variant hirudine; et la dite région additionnelle comporte un seul site de clivage reconnu par la protéinase yscF, qui constitue la partie C-terminale de la dite région additionnelle,
un second fragment d'ADN codant pour un peptide leader;
15 le dit second fragment d'ADN étant associé en phase à la partie 5' du dit premier fragment d'ADN,
des régions de régulation appropriées pour l'expression des dits fragments d'ADN comportant un promoteur d'un gène de levure différent du promoteur du gène MF alpha 1.

20

2. Bloc fonctionnel d'ADN selon la revendication 1, dans lequel le premier fragment d'ADN code pour un précurseur d'un variant hirudine; le dit précurseur comprenant le dit variant hirudine et une région additionnelle reliée par une liaison
25 peptidique à l'extrémité N-terminale du dit variant hirudine; et le dit précurseur étant caractérisé en ce que la région additionnelle comprend un site de clivage unique qui est le dit peptide Lys-Arg.

30 3. Bloc fonctionnel d'ADN selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel le premier fragment d'ADN code pour un précurseur du variant HV1 ou HV2.

4. Bloc fonctionnel d'ADN selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le second fragment d'ADN code pour un peptide leader qui est le "pré" fragment du précurseur "pré-pro" du facteur alpha.

5

5. Bloc fonctionnel selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le dit promoteur est le promoteur du gène PGK de levure.

10 6. Levure transformée par un bloc fonctionnel d'ADN selon l'une des revendications 1 à 5.

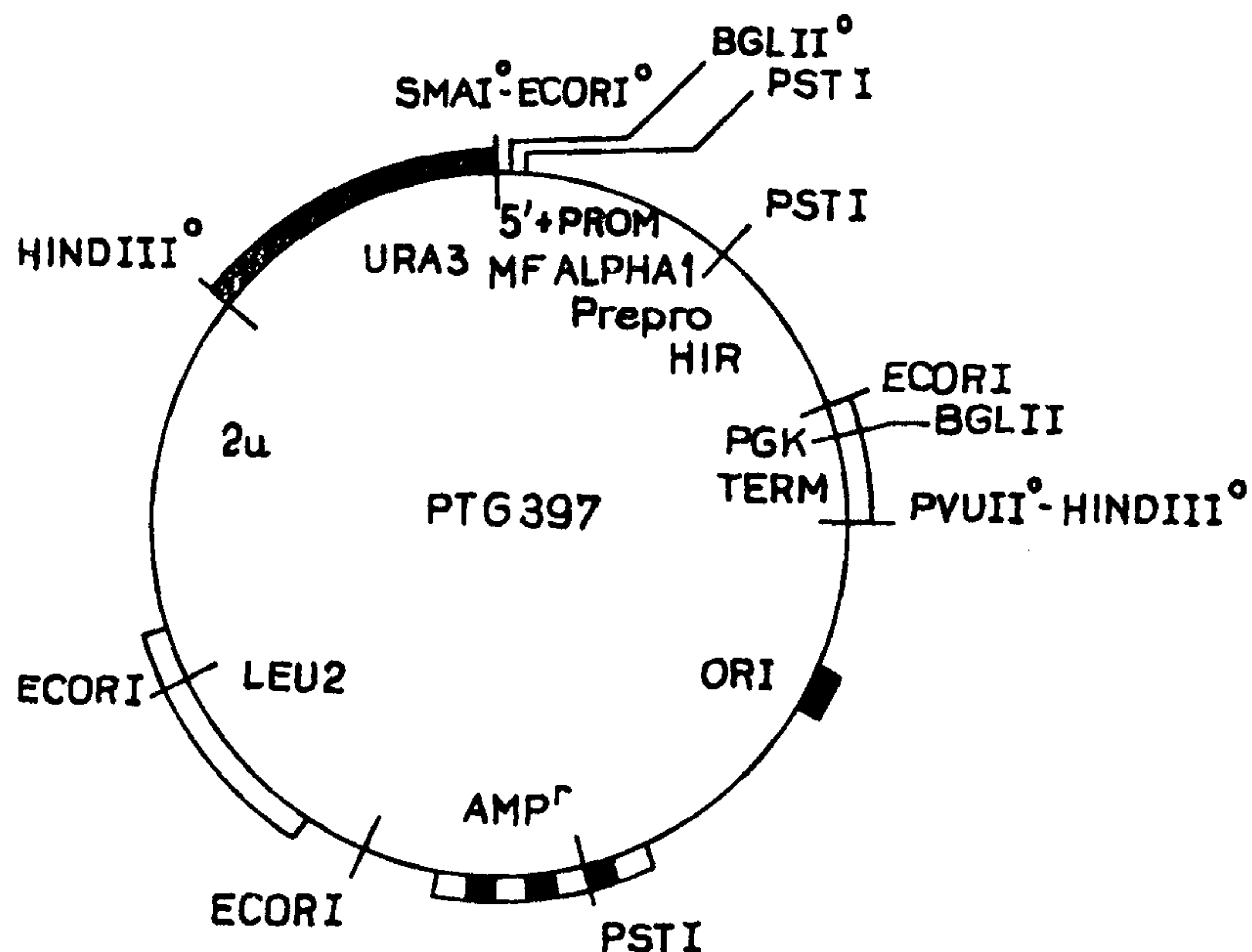
7. Levure selon la revendication 6, caractérisée en ce que le bloc fonctionnel d'ADN est inséré dans un plasmide qui
15 comprend une origine de répllication fonctionnelle dans les levures.

8. Un plasmide qui comporte un bloc fonctionnel d'ADN selon l'une des revendications 1 à 5, et une origine de répllication
20 fonctionnelle dans les levures.

9. Procédé de préparation d'un variant par fermentation d'une levure selon l'une des revendications 6 ou 7 et récupération du variant hirudine produit dans le surnageant du
25 milieu de culture.

1/11

1341490



DOUBLE DIGESTION PSTI - BGLII

CLONAGE DANS M13TG131 AUX SITES PSTI - BAMHI

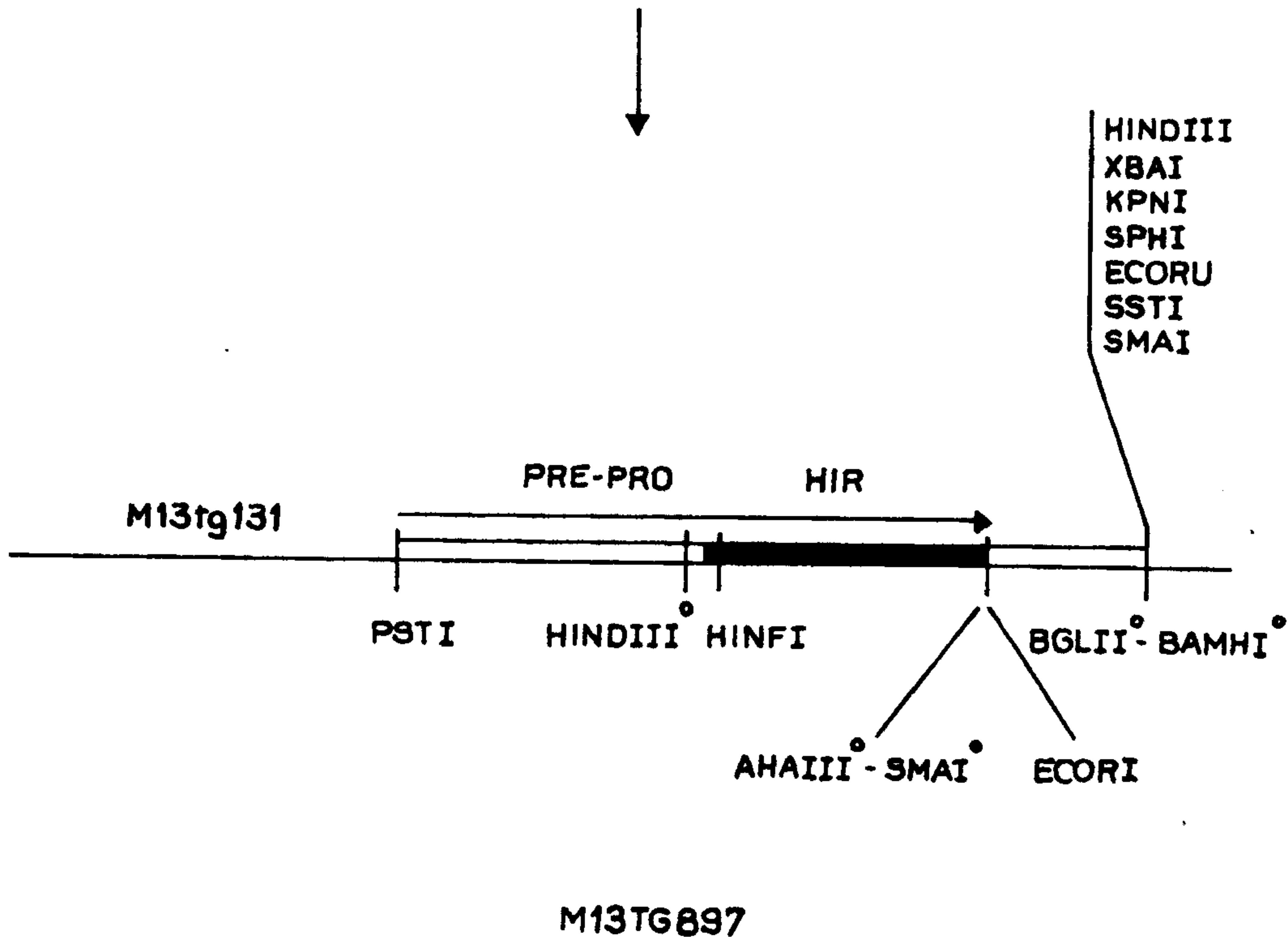


FIG. 1

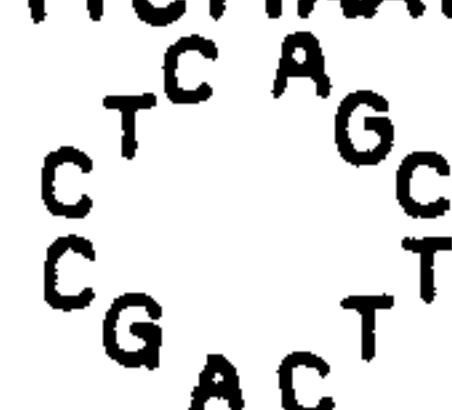
2/11

1 3 4 1 4 9 0

Hybridation du DNA de M13TG897 avec l'oligon. de
la mutagenese



(a) 5'-TCTTTGGATAAAAGAATTACGTATACAGAC-3'
(b) 3' ... TTCCCCATAGAAACCTATTTTCTTAATGCATATGTCTGACG... 5'



Elongation du brin complémentaire
par la polymérase de Klenow



Ligation Transformation E.coli



(c) 3' ... TTCCCCATAGAAACCTATTTTCTTAATGCATATGTCTGACG... 5'

FIG. 2

MUTAGENESE IN VITRO

Handwritten signature:
E. coli

3/11

1341490

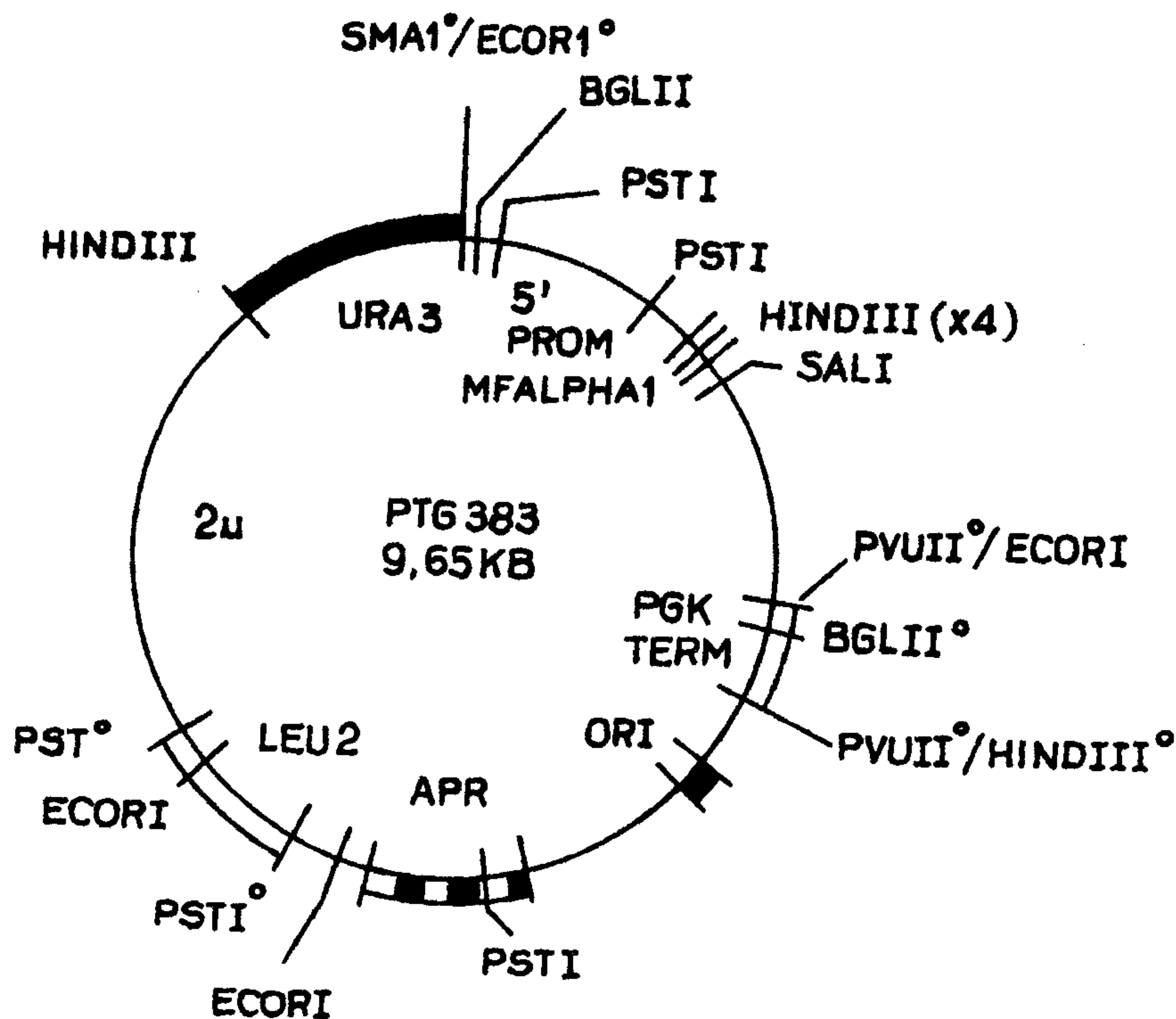
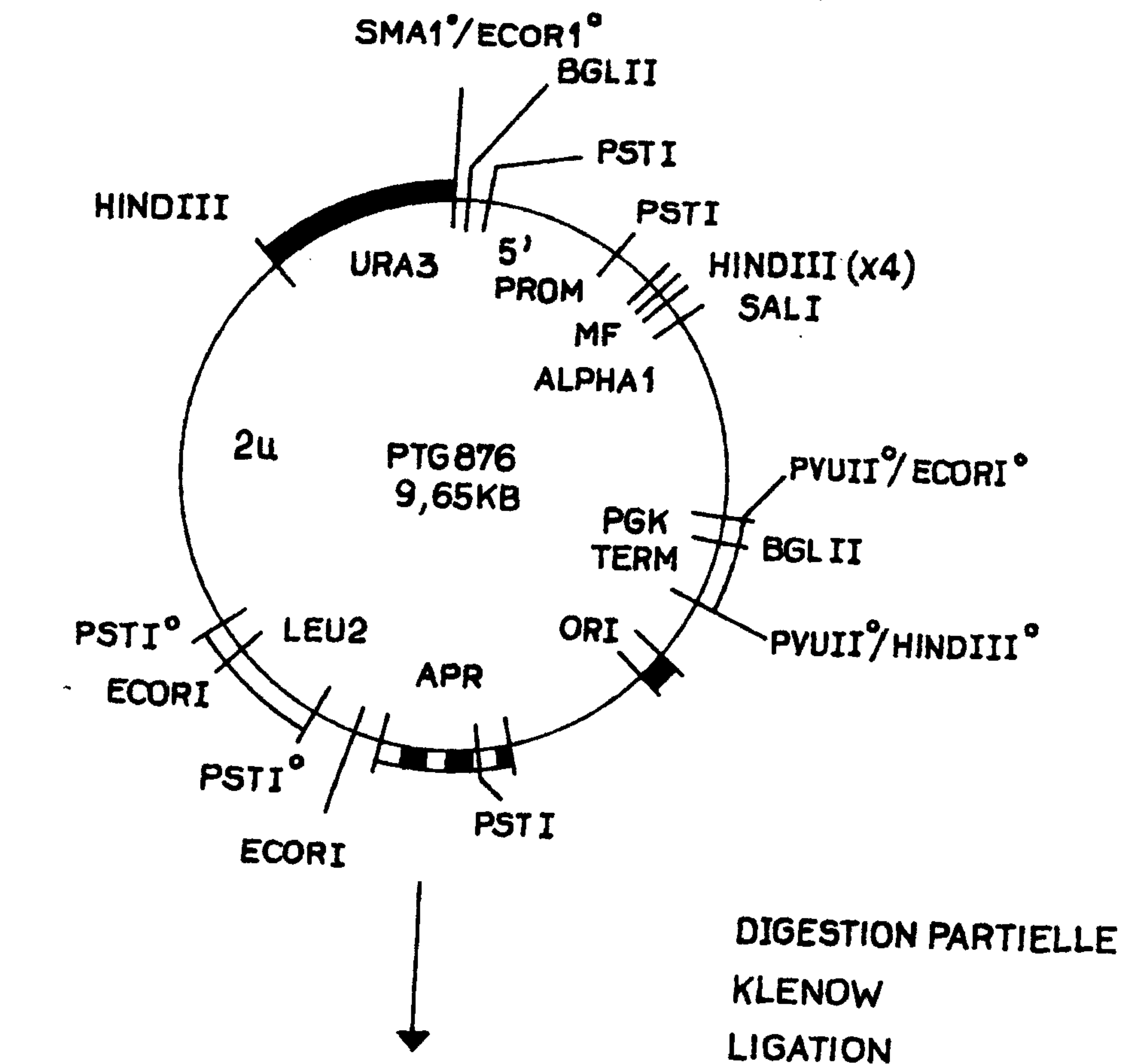
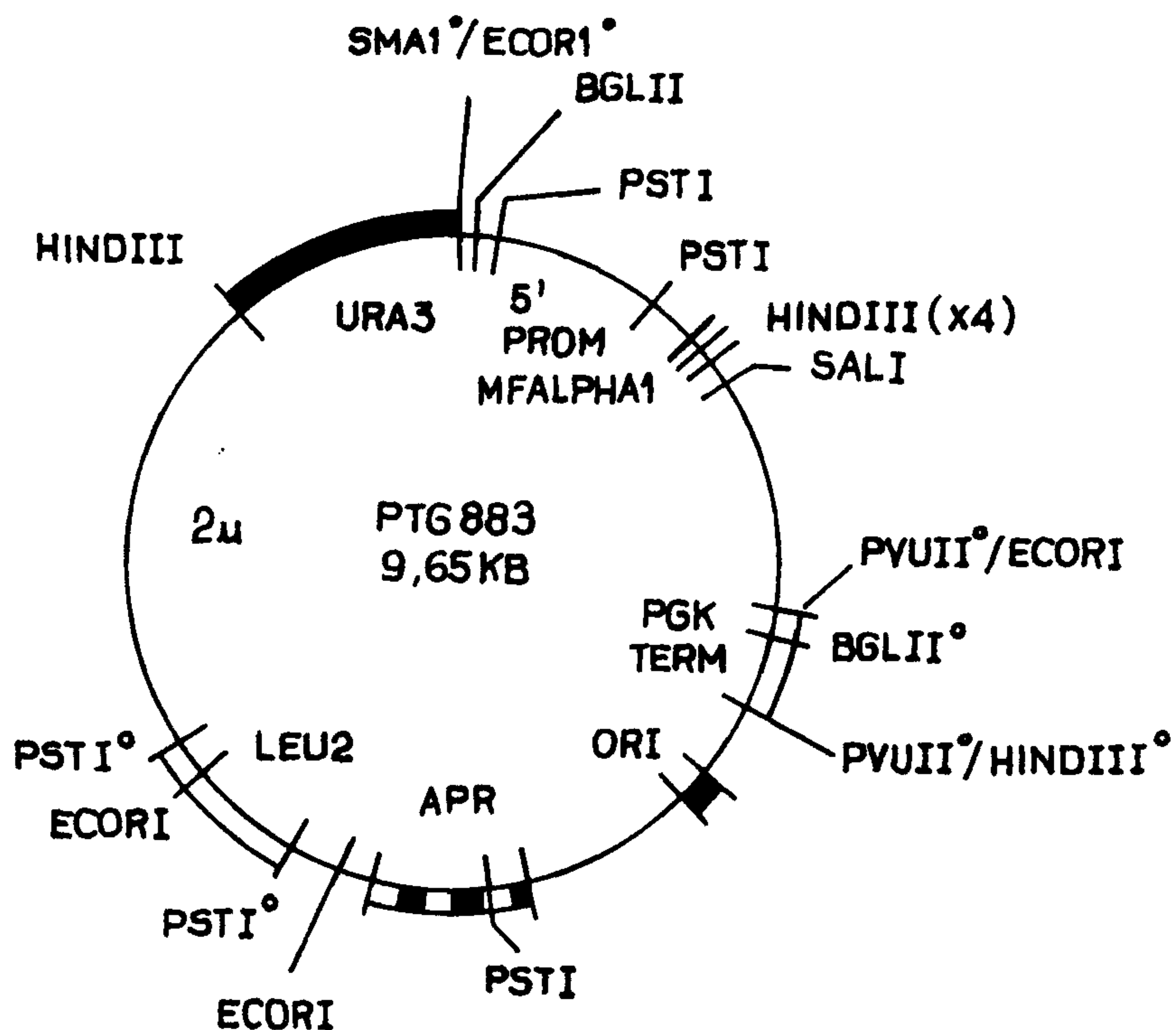


FIG. 3

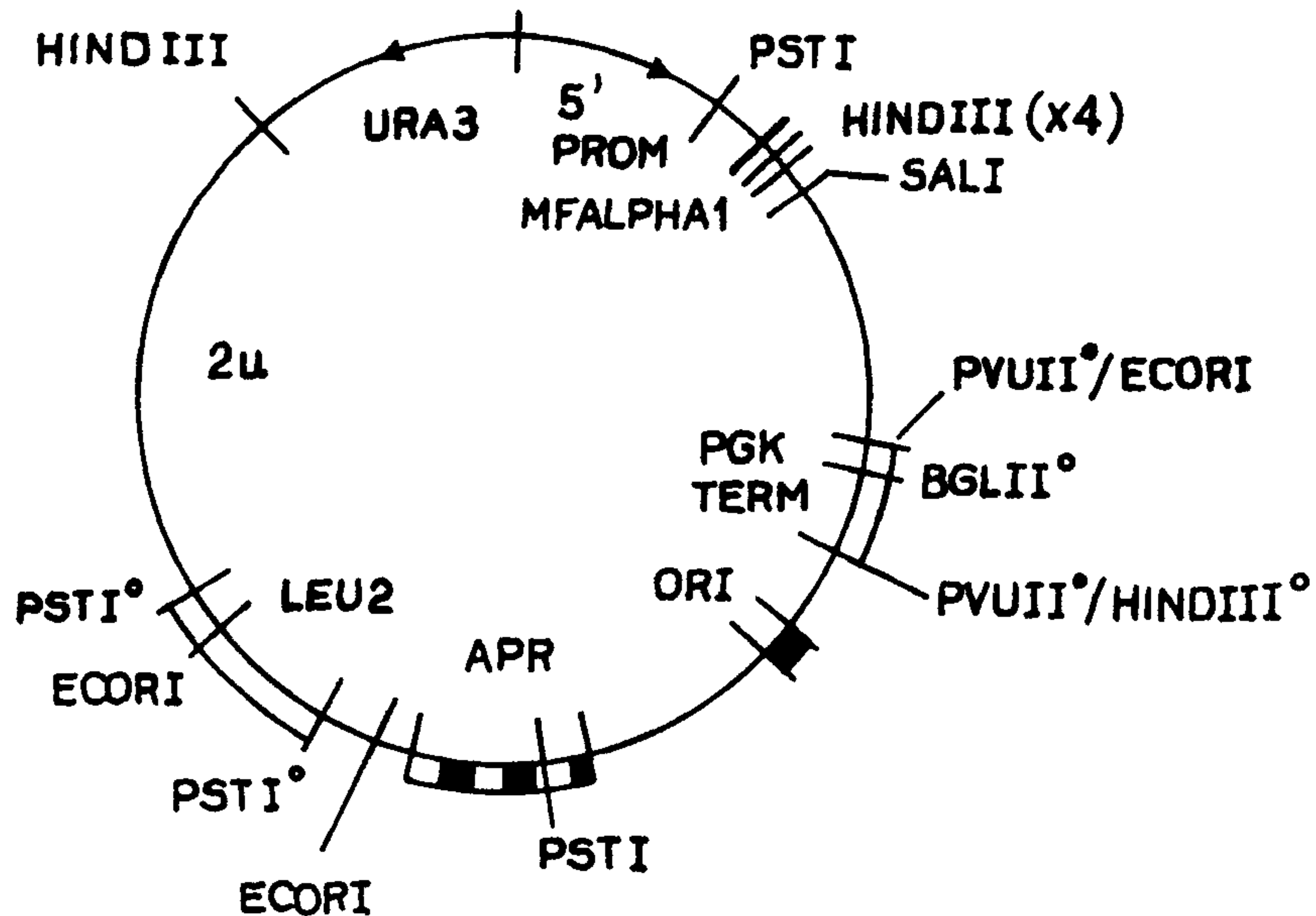
Handwritten signature
Date: 11/11/88

4/11

1341490



- Ouverture par Bgl II
- Génération de délétions par action de Bal 31
- Insertion d'un site BamHI 1 paire de base en amont de l'ATG initiateur de MFalpha 1



CONSTRUCTION DE PTG892 A PARTIR DE PTG 883

FIG.4

Handwritten signature and date:
 11/11/88

5/11

1341490

- Digestion du DNA de pTG892 par SalI et BamHI.
- Isolement du fragment de DNA le plus court.
- Clonage de ce fragment entre les sites SalI et BamHI du polylinker de M13tg120.



M13tg889

STRUCTURE DE M13TG889

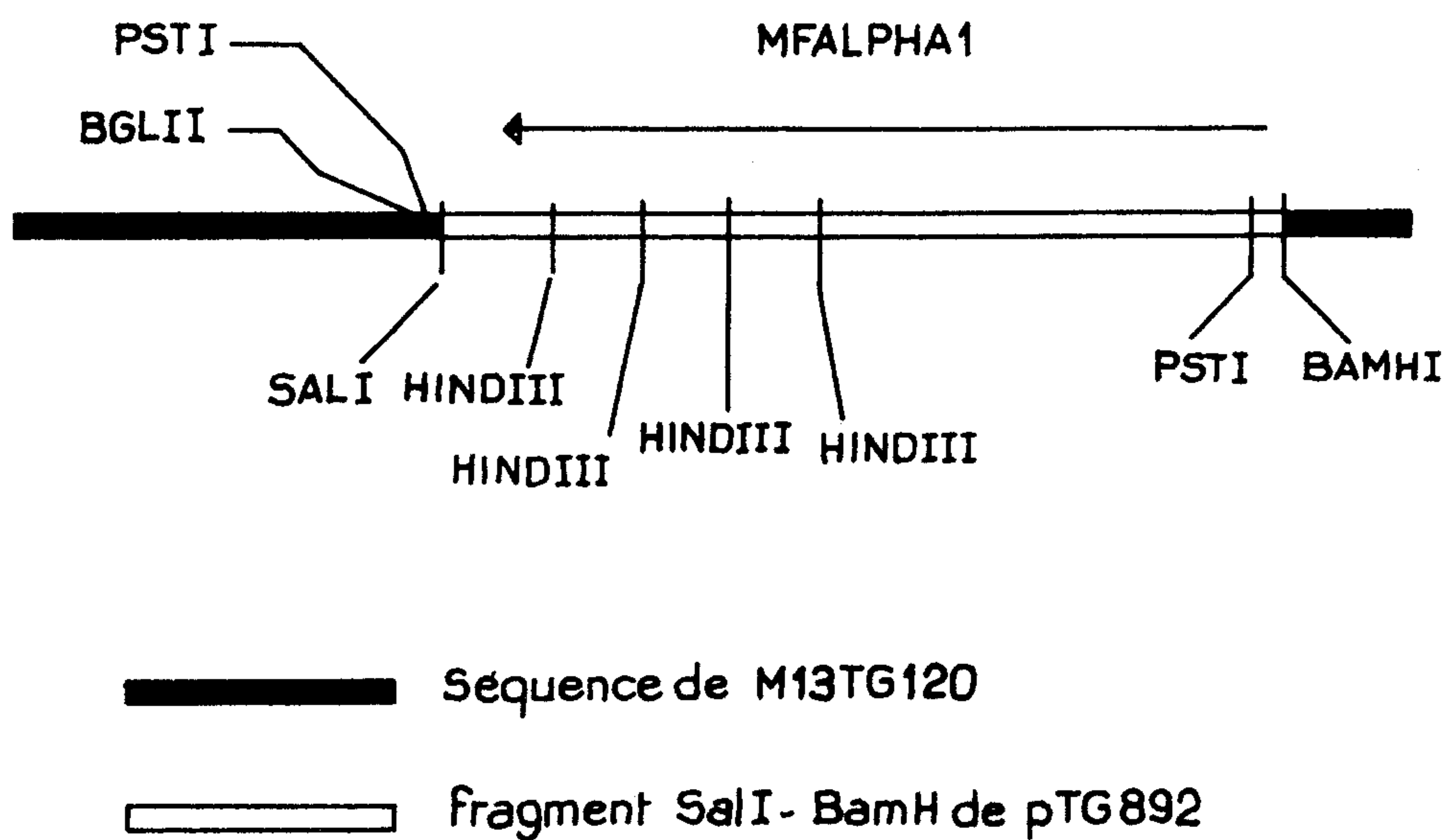


FIG.5

Handwritten signature

6/11

1341490

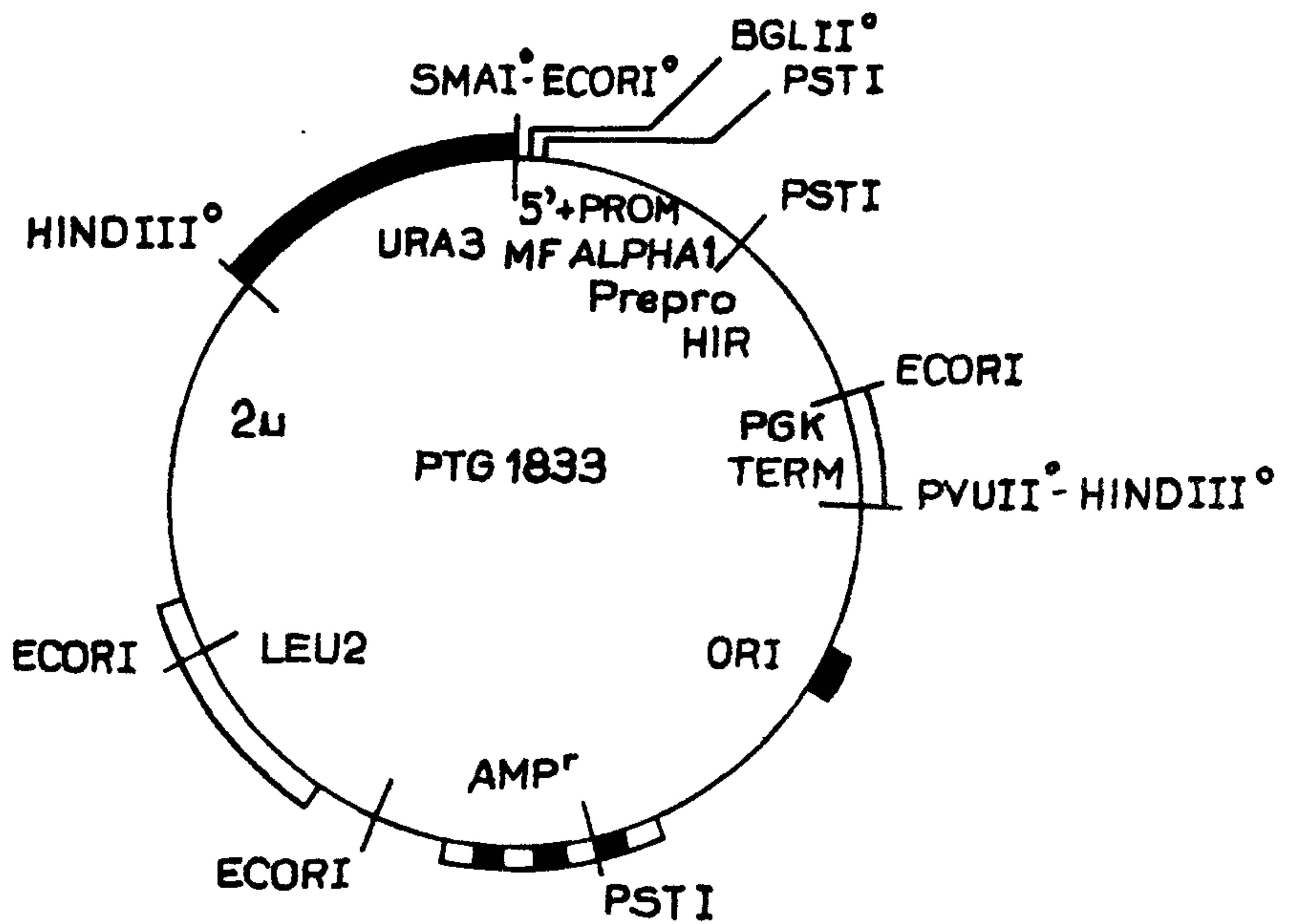
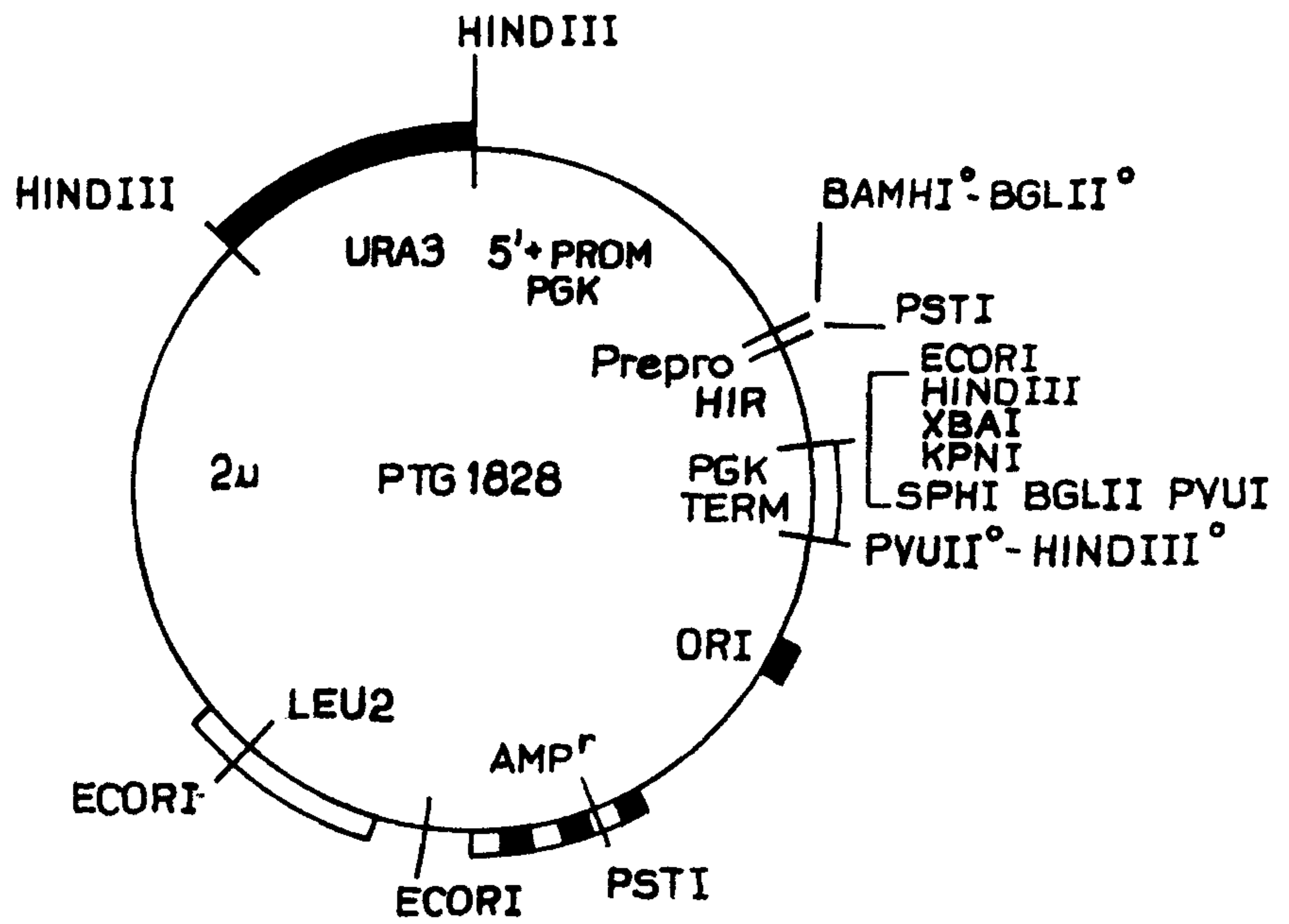


FIG. 6

coupure endopeptidasique YSCF



phéromone α ... Lys Arg Glu Ala Glu Ala Trp His ...

pTG886 ... Lys Arg Glu Ala Glu Ala Trp Leu Gln Val Asp Gly Ser Met Ile Thr ...

pTG897 ... Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ile Thr ...

pTG1805 ... Lys Arg Glu Ala Glu Ala Lys Arg Ile Thr ...

pTG1818 ... Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Leu Asp Lys Arg Ile Thr ...

pTG1828

... Lys Arg Ile Thr ...

pTG1833

7/11

1 3 4 1 4 9 0

FIG-7

10/10/2004, 14h00

8/11

1341490

FIG. 8

HIND III

1 4
AGCTTCTTTGGATAAAAGAGTCGTATACACTGACTGCACCGAATCCGGTCAGAA.,
AGAAACCTATTTTCTCAGCATATGTGACTGACGTGGCTTAGGCCAGTCTT.,
2 3 5

6 8
CCTGTGCCTGTGCGAAGGTTCTAACGTTTGCGGTCAGGGTAACAAA.,
GGACACGGACACGCTTCCAAGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTT.,
7

10 11
TGCATCCTCGGATCCGACGGTGAAAAAACCAGTGCGTTACAGGTGAA.,
ACGTAGGAGCCTAGGCTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAATGTCCACTT.,
9 12

14
GGTACTCCGAAACCGCAGTCTCATAACGACGGTGACTTCGAA.,
CCATGAGGCTTTGGCGTCAGAGTATTGCTGCCACTGAAGCTT.,
13 15

17 19
GAAATTCAGAAGAATCTTGCAGTAATAAGATCTG
CTTTAAGGTCTTCTTAGAACGTCATTATTCTAGACAGCT
16 18 SALI

9/11

1341490

FIG. 9

		1-HinfI		2-HinfI	
1-AluI		1-AccI		1-HpaII	
1	V	V	V	V	V
AGCTTCTTTGGATAAAAGAGTCGTATACACTGACTGCACCGAATCCGGTC					
1		23		45	
		18		41	
		1-MaeII		1-MaeIII	
		1-NsiI		1-NsiI	
		V	V	V	100
AGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGTTCTAACGTTTGCGGTCAGGGTAACAAA					
		78		100	
				93	
		1-Sau3A			
		2-EinI			
		1-XhoII			
		1-NlaIV			
		1-EinI			
		1-EamHI			
		1-MnlI			
		1-FokI			
		1-SfaNI			
		1-HphI		2-MaeIII	
		2-HphI		1-RsaI	
101	VV	V	VV	V	V
TGCATCCTCGGATCCGACGGTGAAAAAACCAGTGCGTTACAGGTGAAGGTACT					
		119		143	
102				137	
103					150
106					
	110				
	110				
	110				
	110				
	111				
	111				

10/11

1341490

FIG. 9

1-XmrI
1-MboII
1-TaqI
1-AsuII
3-MaeIII
3-HphI
2-MboII
VV VV V V 200
CCGAAACCGCAGTCTCATAACGACGGTGAAGAAATTCAG
179 200
180

185
186
188
188

2-Sau3A
2-XhoII
1-EglII
VV
201 AAGAATACTTGCAGTAATAAGATCTG-----I 30
220
220
221

///

1341490

FIG. 10

11

ATG GTA GTT TAT ACC GAC TGC ACC GAA TCC
Met Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser

41

GGT CAG AAC CTG TGC CTG TGC GAA GGT TCT
Gly Gln Asn Leu Cys Leu Cys Glu Gly Ser

71

AAC GTT TGC GGT CAG GGT AAC AAA TGC ATC
Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys Ile

101

CTC GGA TCC GAC GGT GAA AAA AAC CAG TGC
Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys

131

GTT ACA GGT GAA GGT ACT CCG AAA CCG CAG
Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln

161

TCT CAT AAC GAC GGT GAC TTC GAA GAA ATT
Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile

191

CCA GAA GAA TAT TTA CAA TGA AAA ATG AAA
Pro Glu Glu Tyr Leu Gln *** Lys Met Lys

221

GAA TAT CAA TCA TAG AGA ATT TTG ATT T
Glu Tyr Gln Ser *** Arg Ile Leu Ile ***

251

Handwritten signature