

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 562 090

(21) N° d'enregistrement national :

84 04754

(51) Int Cl⁴ : C 12 P 21/00; A 61 K 39/205; C 12 N 15/00 //
C 12 R 1/865.

(12)

**DEMANDE DE CERTIFICAT D'ADDITION
À UN BREVET D'INVENTION**

A2

(22) Date de dépôt : 27 mars 1984.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 40 du 4 octobre 1985.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés : 1^{re} addition au brevet 83 15716 pris le 3 oc-
tobre 1983.

(71) Demandeur(s) : *TRANSGENE SA.* — FR.

(72) Inventeur(s) : Yves Lemoine, Gérard Loison, Michel
Aigle, Richard Lathe, Marie Paule Kiény et Jean Pierre
Lecocq.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin,
Schrimpf, Warcoin et Ahner.

(54) Protéine antigénique de la rage glycosylée.

(57) La présente invention concerne une protéine antigénique
de la rage, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine
glycosylée par une levure.

FR 2 562 090 - A2

La présente invention concerne un perfectionnement aux produits décrits dans le brevet principal.

A travers tout le règne vivant, la N-glycosylation (au niveau d'un résidu asparagine) d'une protéine donnée dépendra au minimum de trois facteurs relativement bien établis :

- l'existence au niveau du résidu asparagine envisagé de la structure primaire Asp-X-Ser ou Asp-X-Ther où X peut représenter tout acide aminé avec toutefois des restrictions pour l'aspartate et la proline ;
- l'accessibilité de ce résidu asparagine à la glycosyl transférase nécessite l'existence au niveau de cette séquence d'une structure secondaire donnée, bien souvent de type hélice β ;
- le transit de cette protéine dans le réticulum endoplasmique où se trouvent localisés les enzymes de biosynthèse et de transfert (sur le résidu asparagine accepteur de la protéine) du précurseur universel, $(\text{glc})_3 (\text{man})_9 (\text{glcNAc})_2$ -P-P-dolichyl.

Cette dernière condition peut, en première analyse, être réalisée lorsque la protéine donnée est synthétisée sous forme d'un précurseur pourvu d'un "peptide signal" situé en général du côté aminoterminal de la protéine mature. En effet, la synthèse de ce peptide signal au niveau du complexe cytoplasmique de traduction permettrait à celui-ci, par un mécanisme moléculaire encore obscur, de migrer vers la membrane externe du réticulum endoplasmique. La synthèse de polypeptide se poursuivrait ensuite simultanément à la translocation de la chaîne en cours d'élongation à travers la membrane du réticulum endoplasmique. En couplage intime avec cette translocation, se produit dans le réticulum le transfert du précurseur universel $(\text{glc})_3 (\text{man})_9 (\text{glcNAc})_2$ -P-P-dolichyl sur les

résidus asparagines potentiellement accepteurs, c'est-à-dire répondant au minimum aux conditions précitées.

La glycoprotéine de la rage, lors de l'infection de cellules par le virus de la rage, est synthétisée sous
5 forme d'un précurseur comprenant une séquence signal amino terminale de 19 résidus d'acides aminés, de nature essentiellement hydrophobe.

Au niveau de la protéine mature, deux résidus asparagines (204 et 319), correspondent à deux des trois
10 séquences consensus Asp X Ser/Thr existant dans la séquence primaire sont effectivement glycosylés.

Dans le vecteur d'expression dans la levure, décrit au brevet principal, le cDNA correspondant à la glycoprotéine de la rage contient l'information nécessaire
15 à la synthèse du précurseur pourvu de la séquence signal.

De par sa qualité d'eucaryote, la levure est un hôte de choix pour obtenir des modifications post-traductionnelles spécifiques, à savoir, par exemple, la N glycosylation de la glycoprotéine rabique. Il n'est pas déraisonnable d'envisager que le précurseur de la glycoprotéine
20 en voie de synthèse dans la levure soit dirigé vers le réticulum endoplasmique où se trouvent localisés les enzymes de synthèse et de transfert du précurseur (glc₂) (man)₉ (glcNAc)₂-P-Pdolichyl. Si tel est le cas, on peut s'attendre à une N-glycosylation constituée exclusivement de résidus N acétylglucosamines et de résidus mannoses (éventuellement de résidus glucoses si aucune maturation n'a lieu ensuite).

C'est pourquoi la présente invention couvre une
30 protéine antigénique de la rage caractérisée en ce qu'elle comporte une glycosylation de levure en particulier une glycosylation effectuée par une souche de *S. cerevisiae*.

De préférence, la glycosylation est effectuée

au niveau des deux résidus asparagines 204 et 319.

Pour ce faire le vecteur mis en oeuvre pour transporter les levures est un vecteur selon le brevet principal, caractérisé en ce qu'il comporte dans la séquence ADN(I) tout ou partie de la séquence signal amino terminal codant pour les 19 résidus d'acides amines de ladite séquence signal.

Enfin, la présente invention concerne des vaccins ou des compositions curatives contenant à titre de principe actif, notamment, une protéine antigénique de la rage glycosylée décrite précédemment.

Les exemples ci-après sont destinés à mettre en évidence les composés selon la présente invention.

Afin de tester si la glycoprotéine du virus de la rage exprimé dans la levure, détectée par immunoprécipité, était effectivement glycosylée, la glycoprotéine a été soumise à l'action de l'endo- β -N acétylglucosaminidase H in vitro. D'autre part, l'action de la tunicamycine in vivo sur la glycoprotéine exprimée dans la levure a également été examinée.

L'endo- β -N acétylglucosaminidase H clivera la liaison entre les résidus N acétylglucosamine du groupement N acétylchitibiose lié au résidu asparagine, lorsque trois conditions sont remplies :

- le groupement glycosylé doit être de nature neutre, c'est-à-dire constitué, en plus du N acétylchitibiose, uniquement de résidus mannoses (en ce qui concerne la partie sucre) ;
- il faut au minimum cinq résidus mannoses couplés au groupement N acétylchitibiose ;
- le groupement glycosylé doit être accessible à l'enzyme endo- β -N acétylglucosaminidase H ; si dans la conformation native de la protéine considérée, ceci n'est pas

le cas, l'action enzymatique de l'endo H doit être effectuée dans ces conditions partiellement dénaturantes (SDS 0,5 %, β mercaptoéthanol 50 mM).

Protocole expérimental : Les cellules (ségrégeant TGY2 spl3b identique à TGY1 mais leu² au lieu de his⁻ exprimant ou non la glycoprotéine de la rage, c'est-à-dire transformée par pTG 856 ou pTG849) dont les protéines ont été préalablement marquées à la méthionine ³⁵S (254 μ Ci à raison de 115 Ci/mmoles, marquage 10 minutes) sont récoltées en phase exponentielle de croissance (milieu YNBG X leucine 20 μ g/mg) et resuspendus dans le tampon Tris-HCl 12,5 mM pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, KCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,8 TRITON X-100 1 %, PMSF 2 mM additionné de 2,5 μ g de DNase I.

Après broyage à l'aide de billes de verre et légère centrifugation, 4 10^6 cpm-correspondant à un aliquote du surnageant - sont engagés dans un immunoprécipité avec 5 μ l de sérum polyclonal de lapin n° 215 dressé contre la glycoprotéine de la rage (à 4° pendant 16 h).

Après addition de 8 mg de protéine A sépharose et incubation d'une heure à température ambiante, le culot de protéine A sépharose obtenu après centrifugation est remis en suspension dans 200 μ l de tampon SDS 0,5 % BSA 0,1 mg/ml, citrate de Na pH 5,5 0,27 M, β mercaptoéthanol 50 mM. Après chauffage à 100 ° C pendant 10 minutes, deux fractions, chacune de 100 μ l, sont constituées. A la première est additionné 1 μ l (50 nanog) d'endo- β -N acétylglucosaminidase H (NEN) ; les deux fractions sont ensuite incubées à 37°C pendant 16 heures.

Une dialyse extensive des deux fractions est effectuée contre du SDS 0,5 % en solution aqueuse ; ensuite, les concentrations finales des échantillons sont amenées à 2 % en SDS et à 5 % en β -mercaptoéthanol. Les fractions sont bouillies pendant 10 minutes pour être ensuite déposées sur gel de polyacrylamide 10 %.

L'analyse des résultats montre que l'endo- β -N acétylglucosaminidase H diminue le poids moléculaire de la sous-unité de la glycoprotéine rabique produite dans la levure d'environ 5000 Daltons (respectivement 63.000 sans endo H et 58.000 après action de l'endo H) ce qui correspond au poids moléculaire de la glycoprotéine mature exprimée dans E. coli).

Il a été démontré que, dans les conditions expérimentales utilisées, aucune activité protéolytique - résultant d'une contamination de l'endo H - n'est détectable.

La tunicamycine, mélange d'antibiotiques de structures apparentées, produite à partir de Streptomyces lysosuperificus inhibe la première étape de synthèse du précurseur (glc)₂ (man)₉ (glcNAc)₂-P-P-dolichyl.

Son action in vivo est bien documentée et permet de mettre en évidence les précurseurs de glycoprotéines totalement dépourvus de sucres au niveau des résidus asparagines.

Protocole expérimental :

Les souches de levure (TGY2 spl3b exprimant ou non la glycoprotéine de la rage), en phase exponentielle de croissance sur YNBG + leucine 20 μ g/ml, sont préincubées avec de la tunicamycine (15 μ g/ml) pendant 30 minutes. Un test préliminaire a montré que cette concentration conduit à une absence totale de croissance sur ce milieu pour les souches utilisées.

Après cette préincubation, de la méthionine ³⁵S (254 μ Ci à raison de 1115 Ci/mmoles) est additionnée au milieu et les cellules sont récoltées après 10 minutes de marquage. Elles sont resuspendues dans le tampon TRIS-Cl 12,5 mM pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, KCl 0,5 M, TRIS-Cl 50 mM pH 8,8, TRITON X-100 1 %, PMSF 2 mM additionné de 2,5 μ g de DNase I.

Après broyage à l'aide de billes de verre et légère centrifugation, $2 \cdot 10^6$ cmp - correspondant à un aliquote du surnageant - sont engagés dans un immunoprécipité avec 5 μ l de sérum polyclonal de lapin n° 215
5 dressé contre la glycoprotéine native de la rage (à 4°C pendant 16 heures).

Après addition de 8 mg de protéine A sépharose et incubation d'une heure à température ambiante, le culot de protéine A sépharose, obtenu après centrifugation, est
10 lavé 3 fois avec KCl 0,5 M TRIS-Cl pH 8,8 10 mM TRITON X-100, 0,5 % et 3 fois avec TRIS-Cl 10 mM pH 8,8. Le culot est enfin resuspendu dans 30 μ l du mélange de dénaturation (SDS 10 %, β -mercaptoéthanol 25 %, glycérol 50 %, TRIS-CL pH 6,8 0,325 M), bouilli 10 minutes à 100°C, pour
15 être ensuite déposé sur gel de polyacrylamide 10 %.

L'analyse des résultats montre que l'effet in vivo de la tunicamycine - exactement comme l'action de l'endo- β -N acétylglucosaminidase H in vitro - diminue le poids moléculaire de la sous-unité de la glycoprotéine rabique
20 produite dans la levure d'environ 5000 Dalton.

La similitude des résultats, après l'emploi de deux méthodologies tout à fait différentes - action de l'endo H in vitro et in vivo de la tunicamycine - montre clairement que la glycoprotéine du virus de la rage pro-
25 duite dans la levure est effectivement glycosylée.

REVENDICATIONS

1. - Protéine antigénique de la rage selon les revendication du brevet principal, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine glycosylée par une levure.

5 2. - Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la glycosylation a été effectuée par une souche de *S. cerevisiae* transformée par un plasmide selon l'une des revendications du brevet principal.

10 3. - Protéine selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle est glycosylées sur les résidus asparagine 204 et 319.

4. - Vaccin ou composition curative, caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif au moins un protéine selon l'une des revendications 1 à 3.