

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

2 636 643

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national :

88 11188

(51) Int Cl⁵ : C 12 N 15/12, 15/15, 15/18; C 12 P 21/00,
19/34 // A 61 K 37/36, 35/62; C 07 K 7/26; (C 12 N
15/12, C 12 R :19).

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 24 août 1988.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 12 du 23 mars 1990.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : *SANOFI, Société Anonyme.* — FR.

(72) Inventeur(s) : Richard Legoux ; Pascal Leplatois ; Eve-
lyne Joseph-Liauzun ; Gérard Loison ; Willem Roskam.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

(54) Peptide-signal, séquences d'ADN codant pour celui-ci, vecteurs d'expression portant l'une de ces séquences et
procédé de production périsplasmique d'un polypeptide.

(57) L'invention concerne un peptide-signal de formule :
MAPSGKSTLLLLFLLLCLPSWNAGA

où A = Alanine
C = Cystéine
F = Phénylalanine
G = Glycine
K = Lysine
L = Leucine
M = Méthionine
N = Asparagine
P = Proline
S = Sérine
T = Thréonine
W = Tryptophane.

Elle concerne également les séquences d'ADN codant pour
celui-ci, les vecteurs d'expression portant l'une de ces sé-
quences et le procédé de production périsplasmique d'un poly-
peptide par une souche de bactéries gram négatives transfor-
mée par l'un de ces vecteurs.

Application : fabrication de polypeptides, tels que l'hGH ou
l'hirudine.

FR 2 636 643 - A1

D

Peptide-signal, séquences d'ADN codant pour celui-ci, vecteurs d'expression portant l'une de ces séquences et procédé de production périplasmique d'un polypeptide.

05 La présente invention concerne un peptide-signal. Elle concerne également les séquences d'ADN codant pour ce peptide-signal et les vecteurs d'expression portant l'une de ces séquences. Elle concerne encore un procédé de production périplasmique d'un polypeptide par une souche de bactéries gram négatives transformée
10 par l'un de ces vecteurs.

 Il est connu que les bactéries gram négatives produisent naturellement des polypeptides, synthétisés sous la forme d'un précurseur dans le cytoplasme et exportés vers le périplasma, espace compris entre la membrane cytoplasmique et la paroi bactérienne, où ils s'accumulent sous la forme d'un polypeptide mature,
15 c'est-à-dire d'un polypeptide capable d'assurer son action biologique spécifique. Parmi ces polypeptides figurent notamment des enzymes, telles que par exemple la phosphatase alcaline.

 Il est connu également que l'on peut utiliser des
20 bactéries gram négatives pour leur faire produire dans leur périplasma un polypeptide qui leur est étranger. Une telle production périplasmique revêt un intérêt certain car la séparation dudit polypeptide des autres constituants du périplasma est plus facile que la séparation de celui-ci des autres composants du cytoplasme,
25 telle qu'elle est requise dans le cas d'une production avec accumulation cytoplasmique. Elle est également intéressante car le polypeptide s'accumule sous sa forme mature sans qu'il y ait addition d'une méthionine N-terminale qu'il faudrait ensuite éliminer et sans qu'il y ait adoption d'une conformation secondaire défavorable.
30

 On sait que, pour que sa production soit périplasmique, un polypeptide doit être synthétisé sous la forme d'un précurseur correspondant au polypeptide mature allongé à son extrémité N-terminale d'un peptide constitué généralement de 15 à 30 acides
35 aminés appelé peptide-signal. Ce peptide-signal, qui joue un rôle

déterminant dans la sécrétion du polypeptide, est clivé au cours du processus libérant ainsi le polypeptide mature dans le périplasme.

S'agissant d'adapter des bactéries à la production périsplasmique d'un polypeptide qui lui était étranger et notamment d'origine eucaryote, les premiers travaux ont consisté à transformer les bactéries à l'aide d'un vecteur d'expression portant une séquence d'ADN codant pour un précurseur naturel dudit polypeptide. Cette stratégie s'est à plusieurs reprises avérée peu adaptée en terme de quantité à une production industrielle.

Une tentative pour apporter une solution satisfaisante a consisté à remplacer le peptide-signal naturel du polypeptide par celui d'un polypeptide bactérien synthétisé sous la forme d'un précurseur. La demande de brevet EP-A-0177343 présente des exemples de mise en oeuvre de tels peptides-sigaux.

La demanderesse, constatant que le choix d'un peptide-signal bactérien pouvait déterminer pour le précurseur d'un polypeptide hétérologue, (notamment d'origine eucaryote) au fur et à mesure de sa synthèse dans la bactérie, la prise par celui-ci d'une conformation secondaire inappropriée, a conçu un nouveau peptide-signal qui répond à la formule :

M A P S G K S T L L L L F L L L C L P S W N A G A

où

A, C, F, G, K, L, M, N, P, S, T et W désignent des acides aminés selon le code suivant :

A = Alanine	M = Méthionine
C = Cystéine	N = Asparagine
F = Phénylalanine	P = Proline
G = Glycine	S = Sérine
K = Lysine	T = Thréonine
L = Leucine	W = Tryptophane

L'invention concerne, selon un autre aspect, les séquences d'ADN codant pour le peptide-signal selon l'invention. Toutes les séquences que permet la dégénérescence du code génétique peuvent être utilisées. Une séquence préférée est la séquence :

5' ATG-GCT-CCA-TCT-GGC-AAA-TCC-ACG-CTG
 CTT-CTC-TTA-TTT-CTG-CTC-CTG-TGC-CTG
 CCC-TCT-TGG-AAC-GCC-GGC-GCT 3'

05 L'invention concerne encore les vecteurs d'expression portant une séquence d'ADN codant pour un précurseur d'un polypeptide caractérisé en ce que la portion de cette séquence codant pour le peptide-signal est une séquence selon l'invention.

Le peptide-signal selon l'invention et les séquences
 10 d'ADN codant pour lui trouvent leur application dans la production périplasmique de polypeptides par les bactéries répondant de manière négative au test de coloration de Gram (ces bactéries sont dites gram négatives). Les souches de l'espèce Escherichia coli conviennent particulièrement ; parmi celles-ci, les souches portant
 15 une ou plusieurs mutations affectant le gène *cya* et/ou le gène *crp* peuvent être utilisées sans inconvénient.

L'invention concerne aussi selon un autre aspect un procédé de production périplasmique d'un polypeptide consistant à transformer une souche de bactéries gram négatives par un vecteur
 20 d'expression portant une séquence d'ADN codant pour un précurseur dudit polypeptide et à cultiver les bactéries de manière que, ladite séquence étant transcrite puis traduite, le polypeptide sous sa forme mature s'accumule dans le périplasme, caractérisé en ce que ledit vecteur porte une séquence d'ADN codant pour le peptide-signal selon l'invention.
 25

Le procédé selon l'invention permet une production aussi bien selon un mode inductible, lorsque l'expression de la séquence d'ADN codant pour le précurseur est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible que selon un mode constitutif, où la produc-
 30 tion du polypeptide est continue dès la mise en culture de la souche transformée.

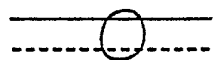
Le procédé selon l'invention convient à la production de toutes sortes de polypeptides hétérologues par rapport à la souche mise en oeuvre. Il est ainsi adapté à la production de polypeptides
 35 d'origine eucaryote. Il peut s'agir de protéines à proprement

parler, telles que notamment l'hormone de croissance humaine (hGH) ou de peptides de plus petite taille, tels que notamment une forme naturelle ou un variant de l'hirudine.

05 La présente invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de deux exemples, dans lesquels il sera fait référence aux trois figures annexées.

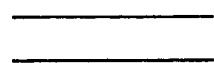
La figure 1 représente une carte de restriction du plasmide p163,1. Les différents segments de restriction sont marqués de manière arbitraire selon la légende ci-dessous :

10

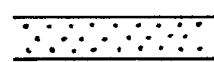
 = Localisation de l'origine de réplication (ORI)

15

 = Segment d'ADN issu du plasmide pBR322

 = Segment d'ADN contenant la séquence codant pour un précurseur naturel de l'hGH

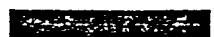
20

 = Segment d'ADN du phage fd contenant un terminateur de transcription

25

 = Segment d'ADN contenant un promoteur-opérateur hybride tryptophane-lactose UV5

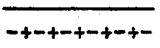
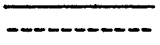
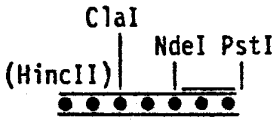
30

 = Segment d'ADN codant pour la β -lactamase (ApR : résistance à l'ampicilline)

35 La figure 2 représente la carte de restriction d'un plasmide dont les fragments PvuI-XhoI-BamHI(1) et PvuI-ORI-bamHI(2) proviennent respectivement des plasmides p163,1 et pBR327 et dont le

petit fragment BamHI(2)-BamHI(1) est le fragment 3 décrit dans l'exemple 1 ci-après.

La figure 3 représente une carte de restriction commune aux plasmides p380,1 et p373,2. Les différents segments de restriction sont marqués de manière arbitraire selon la légende ci-dessous :

- 10  = Séquence PvuI-BamHI issue du plasmide pBR327
- 15  = Séquence PvuI-XhoI issue du plasmide p163,1
- 20  = Séquence XhoI-HincII issue du plasmide p163,1
- 25  = Fragment 4 décrit dans l'exemple 1 ci-après
- 30  = Fragment 3 décrit dans l'exemple 1 ci-après
- 35  = Segment d'ADN du phage fd contenant un terminateur de transcription

EXEMPLE 1

Production périplasmique d'hormone de croissance humaine

30 Une souche de l'espèce Escherichia coli directement appar-
 tentée à la souche, décrite dans la demande de brevet EP-A-0245138
 et déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes
 (CNCM, Paris, France) le 17 Février 1986 sous la référence I-529,
 est mise en oeuvre. Cette souche porte une mutation cya par
 35 délétion et une mutation crp par délétion.

Un plasmide portant une séquence d'ADN codant pour un précurseur de l'hGH dont le peptide-signal est celui de l'invention a été préparé. Ce plasmide a été dénommé p398.

1. Construction du plasmide p398

05 La stratégie mise en oeuvre a fait appel à des fragments obtenus à partir de plasmides préexistants accessibles au public et à des fragments préparés par voie de synthèse selon les techniques maintenant couramment utilisées.

10 On a soumis le plasmide p163,1 (figure 1), décrit dans la demande de brevet EP-A-0245138 et déposée à la CNCM sous la référence I-530 le 17 Février 1986, à une digestion par les enzymes PvuI et BamHI. Ce plasmide contient le gène codant pour l'hGH. Le fragment PvuI-BamHI - ci-après fragment 1 - contenant le site d'action de l'enzyme de restriction XhoI, représenté sur la figure 1, a été purifié.

15 De même, on a soumis le plasmide pBR327, bien connu de l'homme de l'art, (cf. SOBERON, X et al., Gene, 9 (1980) 287-305) à une digestion par les enzymes PvuI et BamHI. Le fragment PvuI-BamHI - ci-après fragment 2 -, contenant l'origine de répllication, a été purifié.

20 Puis on a préparé le fragment 3, qui est un fragment synthétique BamHI(1)-BamHI(2) contenant le gène lac i et son promoteur dont la séquence est la suivante sur laquelle les deux extrémités du brin son repérées par les nombres 1 et 2 pour préciser l'orientation du fragment dans les plasmides décrits aux figures 2 et 3.

FRAGMENT 3

BamHI(1)

5' GATCC GCGGAAGCAT AAAGTGTAAG GCCTGGGGTG CCTAATGAGT
 GAGCTAACTT ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCGCT TTCCAGTCGG
 GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA
 GGC GGTTTGC GTATTGGGCG CCAGGGTGGT TTTTCTTTTC ACCAGTGAGA
 CGGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCCT GGCCCTGAGA GAGTTGCAGC
 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCACCACC CGAAAATCCT GTTTGATGGT
 GGTTAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGTATCCCA
 CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACGCGCAGCC CGGACTCGGT AATGGCGCGC
 ATTGCGCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC
 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATGGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
 TCCAGTCGCC TTCCCGTTCC GCTATCGGCT GAATTTGATT GCGAGTGAGA
 TATTTATGCC AGCCAGCCAG ACGCAGACGC GCCGAGACAG AACTTAATGG
 GCGCGCTAAC AGCGCGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA
 CGCCAGTCG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC
 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGT CATCCAG CGGATAGTTA ATGATCAGCC
 CACTGACGCG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCCGCTTT ACAGGCTTCG
 ACGCCGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC
 GGC GCGAGAT TTAATCGCCG CGACAATTTG CGACGGCGCG TGCAGGGCCA
 GACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTTGCC CGCCAGTTGT
 TGTGCCACGC GGT TGGAAT GTAATTCAGC TCCGCCATCG CCGCTTCCAC
 TTTTCCCGC GTTTTCGCAG AAACGTGGCT GGCCTGGTTC ACCACGCGGG
 AAACGGTCTG ATAACAGACA CCGGCATACT CTGCGACATC GTATAACGTT
 ACTGGTTTCA CATTACCAC CCTGAATTGA CTCTCTCCG GCGGCTATCA
 TGCCATACCG CGAAAGGTTT TCGCCATTG GATGGTGTCC G

3'

BamHI(2)

Les fragments 1, 2 et 3 ont été alors ligués de manière à obtenir le plasmide intermédiaire décrit à la figure 2.

Ce plasmide a été soumis à une digestion partielle par les enzymes de restriction HincII et PstI. Le grand fragment
 05 HincII-PstI, contenant l'origine de répllication et représenté sur la figure 2, a été ensuite ligué au fragment 4, représenté ci-après, qui est un fragment synthétique d'ADN portant une séquence codant pour les 44 premiers acides aminés d'un précurseur naturel de l'hGH et en amont de cette séquence des signaux de
 10 régulation.

FRAGMENT 4

15
 5' TCGAGCTGACTGACCTGTTGCTTATATTACATCGA

 AGCTCGACTGACTGGACAACGAATATAATGTAGCT
 NdeI

20 TAGCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGATAACAATTTACACAGXXXXXXXXXAAGGAGATATACAT

 ATCGATATTACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCXXXXXXXXTCTCCTCTATATGTA
 ATG GCT ACC GGA TCC CGG ACT AGT CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG

 TAC CGA TGG CCT AGG GCC TGA TCA GAC GAG GAC CGA AAA CCG GAC GAC ACG GAC
 M A T G S R T S L L L A F G L L C L
 -26

25
 XbaI
 CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCT AGA CTT TTT

 GGG ACC GAA GTT CTC CCG TCA CGG AAG GGT TGG TAA GGG AAT AGA TCT GAA AAA
 P W L Q E G S A F P T I P L S R L F
 -1 1

30 GAC AAC GCT ATG CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG CTG GCC TTT GAC ACC TAC

 CTG TTG CGA TAC GAG GCG CGG GTA GCA GAC GTG GTC GAC CGG AAA CTG TGG ATC
 D N A M L R A H R L H Q L A F L T Y

PstI
 CAG GAG TTT GAA GAA GCC TAT ATC CCA AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG CA

 GTC CTC AAA CTT CTT CGG ATA TAG GGT TTC CTT GTC TTC ATA AGT AAG G
 Q E F E E A Y I P K E Q K Y S F
 44
 35

Dans ce fragment, les acides aminés sont désignés par des lettres selon le code suivant :

	A = Alanine	M = Méthionine
	C = Cystéine	N = Asparagine
05	D = Acide aspartique	P = Proline
	E = Acide glutamique	Q = Glutamine
	F = Phénylalanine	R = Arginine
	G = Glycine	S = Sérine
	H = Histidine	T = Thréonine
10	I = Isoleucine	V = Valine
	K = Lysine	W = Tryptophane
	L = Leucine	Y = Tyrosine

Sont successivement soulignées dans ce fragment les séquences -35 (TTGCTT) et -10 (TATAAT) de la séquence promotrice, et la séquence de shine et Dalgarno bien connue de l'homme de l'art. Les X positionnés en amont de cette séquence représentent la suite particulière ci-après de 9 nucléotides :

20

```

5'   TTAACTTT
      -----
      AAATTGAAA   5'
  
```

Le plasmide p380,1 a été ainsi obtenu.

25 Le plasmide p380,1 (figure 3) a été ensuite soumis à une digestion par les enzymes de restriction ClaI et NdeI de manière à en éliminer le petit fragment ClaI - NdeI du fragment 4 ci-dessus et à lui substituer le fragment ClaI - NdeI ci-après :

30

```

      ClaI
5'   CGATAGCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
      TATCGCATATTACACACCTTAACACTCGCCTATTGT

                                     NdeI
      ATTCACACAGTTTTTCGCGAAGAAGGAGATATACA
      TAAAGTGTGTCAAAAAGCGCTTCTTCCTCTATATGTAT   5'
  
```

35

Le plasmide résultant est le plasmide p373,2 (figure 3).

Enfin, le plasmide p373,2 a été soumis à une digestion par les enzymes de restriction NdeI et XbaI de manière à éliminer le fragment NdeI - XbaI du fragment 4 ci-dessus et à lui substituer le fragment NdeI - XbaI synthétique représenté ci-après.

05

NdeI

5 ' TATG GCT CCA TCT GGC AAA TCC ACG CTG
AC CGA GGT AGA CCG TTT AGG TGC GAC
CTT CTC TTA TTT CTG CTC CTG TGC CTG
10 GAA GAG AAT AAA GAC GAG GAC ACG GAC

CCC TCT TGG AAC GCC GGC GCT⁷ TTC CCA
GGG AGA ACC TTG CGG CCG CGA AAG GGT

XbaI

15

ACC ATT CCC TTA T
TGG TAA GGG AAT AGATC 5'

20 Le plasmide p398 ainsi obtenu comporte la séquence d'ADN préférée codant pour le peptide-signal de l'invention. Cette séquence est délimitée ci-dessus par deux flèches.

2. Méthodologie générale

25 Les essais réalisés ont porté sur 6 clones du plasmide p398 (Clones 2, 3, 5, 6, 7 et 8), les résultats étant appréciés par rapport au plasmide p373,2 qui contient une séquence d'ADN codant pour le peptide-signal de l'hGH. Ils ont consisté à cultiver les couples hôte-vecteur concernés, préalablement préparés (cf. § 2.1), dans des conditions telles qu'une biomasse suffisante soit obtenue (cf. § 2.2), et que les cellules soumises à une induction produisent l'hGH (cf. § 2.3), à recueillir par choc osmotique les
30 protéines contenues dans l'espace périplasmique (cf. § 2.4), à soumettre les bactéries à une lyse totale de manière à disposer d'un extrait protéique total (cf. § 2.5), à doser l'hGH périplasmique recueillie en 2.4 (cf. § 2.6) et à analyser par la technique dite du Western Blot les surnageants obtenus en 2.4 et en 2.5
35 (cf. § 2.7).

2.1 Préparation des couples hôte-vecteur

Les couples hôte-vecteur ont été préparés selon les techniques de transformation bactérienne connues de l'homme de l'art et qui sont décrites notamment dans les ouvrages ci-après.

- 05 - Molecular cloning - A Laboratory Manual - T. Maniatis E.F., Fritsch and J. Sambrook - Cold Spring Harbor Laboratory - 1982.
- Experiments in Molecular Genetics - J.H. MILLER - Cold Spring Harbor Laboratory - 1972.

10 2.2 Culture

a) Ensemencement

Une colonie isolée obtenue sur milieu solide, (milieu LB + agar-agar) a été mise en suspension dans 5 ml d'un milieu (milieu LB).

15 Le milieu LB utilisé a les caractéristiques ci-après :

- ses composants introduits avant autoclavage sont :

- . de la Bactotryptone 10 g
- . de l'extrait de levure 5 g
- . du chlorure de sodium 5 g
- 20 . de l'eau distillée qsp 1 l

- son pH est ajusté à 7,3 avant autoclavage

- de l'ampicilline est ajoutée après autoclavage à raison de 100 µg/ml

b) Incubation

25 La suspension préparée en a) a été placée à 37°C pendant 18 h de façon que la culture arrive en phase de croissance stationnaire. La suspension dense obtenue a été diluée en milieu LB de manière à obtenir une valeur de densité optique lue à 600 nm - D₀ à 600 nm - proche de 0,03 puis 25 ml de cette suspension bactérienne ont été mis en incubation à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une D₀ à 600 nm voisine de 0,3.

30

2.3 Induction

A la suspension bactérienne obtenue selon 2.2.b, on a ajouté de l'isopropyl-β-D-thiogalactose (ou IPTG) en quantité telle que sa concentration finale soit égale à 1 mM ; l'IPTG a été ici
35 utilisé pour provoquer le déclenchement et le maintien de la

synthèse du précurseur de l'hGH en neutralisant l'action du répresseur venant normalement se fixer sur l'opérateur-Lactose.

La suspension additionnée d'IPTG a été maintenue sous agitation à 37°C pendant 2 h 30.

05 **2.4 Choc osmotique**

On s'est référé au protocole décrit par N.G. NOSSAL et L.A. HEPPEL dans "The Journal of Biological Chemistry 241 (1966) 3055-3063".

a) Lavage au Tris et à l'EDTA

10 Un échantillon de la suspension, telle qu'obtenue en 2.3. après induction, a été prélevé et centrifugé 5 minutes à 6 000 g.

Le culot a été repris dans un volume de tampon à pH 7 (solution A) (cf. ci-dessus) de façon que la suspension obtenue présente une DO à 600 nm voisine de 10.

15 Le tampon utilisé a été préparé par addition dans de l'eau distillée de :

. tri(hydroxyméthyl)aminométhane-HCl ou Tris-HCl ajouté de façon à avoir une concentration finale de 30 mM.

20 . acide éthylènediaminetétraacétique ou EDTA ajouté de façon à avoir une concentration finale de 1 mM.

b) Action du saccharose

La suspension obtenue en 2.4.a. a été centrifugée 5 minutes à 6 000 g.

25 Le culot a été repris délicatement à volume constant dans une solution B préparée extemporanément et correspondant à la solution A à laquelle est ajouté du saccharose à raison de 15 g pour 100 ml.

30 La suspension a été laissée 10 minutes à 20°C. Puis elle a été centrifugée 5 minutes à 6 000 g. Les tubes de centrifugation ont été placés dans de la glace fondante.

On a éliminé avec soin le surnageant et on lui a substitué (à volume constant) de l'eau désionisée et portée préalablement à la température de la glace fondante.

35 La suspension ainsi préparée (dont la DO à 600 nm était voisine de 10) a été laissée 5 minutes à 0°C.

c) Recueil des protéines à localisation périplasmique

La suspension obtenue en 2.4.b. a été centrifugée 10 minutes à 18 000 g.

Le surnageant qui contenait les protéines à localisation périplasmique a été recueilli.

2.5 Lyse totale

Un échantillon de la suspension, telle qu'obtenue en 2.3. après induction, a été prélevé et centrifugé dans un tube Eppendorf 5 minutes à 6 000 g.

Le culot a été remis en suspension dans un volume de tampon tel que 1 ml de suspension présente une D₀ à 600 nm de 0,2.

Le tampon a été préparé à partir d'un tampon concentré 2 fois comprenant une solution dans l'eau distillée :

- du Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 ;
- du dodécylsulfate de sodium (4 % (p/v)) ;
- du glycérol (20 % (p/v)) ;
- du β -mercaptoéthanol (10 % (p/v)) ;
- du bleu de bromophénol (0,02 % (v/v)).

Le tube a été placé 10 minutes au bain-marie réglé à 100°C puis la suspension a été centrifugée pendant 5 minutes à 6 000 g et le surnageant a été recueilli.

2.6. Dosage de l'hGH périplasmique

Le surnageant obtenu en 2.4.c. a été soumis à une chromatographie de type liquide haute pression à l'aide d'un appareillage muni d'un système d'injection calibré et équipé d'un détecteur réglé sur 220 nm.

On a utilisé :

- . une colonne phase inverse C 8 -300 Angströms, en acier, de 10 cm de longueur et de 4,6 mm de diamètre interne (SYNCHROM référence C 8 R103-10),
- . une phase mobile constituée par un gradient linéaire de 20 minutes passant respectivement de 70 volumes de solution S1 et 30 volumes de solution S2 à 40 volumes de solution S1 et 60 volumes de solution S2.

Les solutions S1 et S2 avaient les caractéristiques suivantes :

. S1 = eau purifiée contenant 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique,

. S2 = acétonitrile pour HPLC contenant 0,08 % (v/v) d'acide trifluoroacétique.

05 Le débit était de 1 ml par minute.

La densité optique des fractions a été mesurée et la quantité d'hGH périplasmique exprimée en microgrammes par ml de surnageant a été déterminée par comparaison avec une gamme étalon préétablie.

10 2.7. Analyse par la technique dite du Western Blot

Il a été procédé successivement aux opérations suivantes :

- séparation électrophorétique sur gel (selon le protocole décrit par LAEMMLI, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) des
15 différentes protéines contenues dans chacun des surnageants obtenus selon 2.4.c. et 2.5 ; le gel utilisé était un gel de polyacrylamide (15 % p/v) contenant 0,5 % de dodécylsulfate de sodium ;

- transfert desdites protéines contenues dans le gel sur un filtre de nitrocellulose (selon la technique de H. TOWBIN et al.
20 Proc. Natl. Acad. Scie. USA 76 (1979) 4350-4354) ;

- immunodétection réalisée selon la technique de BURNETTE (W.W. BURNETTE Anal. Biochem. 112 (1981) 195-203) ; elle implique successivement :

. le rinçage du filtre de nitrocellulose 10 minutes avec
25 un tampon A (Tris-HCl 10 mM, NaCl 170 mM, KI 1 mM) ;

. la mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 30 minutes à 37°C avec un tampon B (tampon A additionné de sérum-albumine bovine à raison de 3 g pour 100 ml) ;

. la mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 18 h à 20°C avec un immun-sérum (un anticorps poly-
30 clonal reconnaissant l'hGH mature et son précurseur) ;

. le rinçage du filtre de nitrocellulose avec le tampon B ;

. la mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 6 h à 20°C avec une solution de protéine A marquée à
35 l'iode 125 à 0,1 microcurie par ml ;

- le rinçage du filtre avec le tampon A ;
- le séchage du filtre entre deux feuilles absorbantes ;
- la mise au contact d'un film radiographique ;
- la révélation du film.

05 3. RESULTATS

3.1 Dosage de l'hGH périplasmique

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-après :

	PLASMIDE TESTE						
	Témoin	PLASMIDE 398					
	373,2	398,2	398,3	398,5	398,6	398,7	398,8
hGH périplasmique exprimé en microgrammes par ml de surnageant recueilli après choc osmotique et ramené à une turbidité telle que DO à 600 nm = 1	1,5	2,5	2,9	2,8	3,1	3,1	3,4

Il apparaît clairement que le plasmide 398 permet une production périplasmique multipliée environ par deux par rapport à celle que permet le plasmide 373,2.

3.2 Analyse par la technique dite du Western Blot

25 L'analyse des films autoradiographiques révèle que le précurseur n'a pas été détecté dans les extraits obtenus après lyse totale des bactéries transformées avec le plasmide p398 alors qu'il est détecté dans les extraits obtenus après lyse totale des bactéries du clone p373,2. Ceci montre que le peptide-signal selon

30 l'invention est à même de permettre, avec une grande efficacité, le franchissement par le précurseur de la membrane cytoplasmique et sa maturation concomitante.

Ces résultats soulignent le grand intérêt de l'utilisation du peptide-signal selon l'invention pour la production péri-

35 plasmique d'une protéine telle que l'hormone de croissance humaine.

EXEMPLE 2 Production périplasmique d'un variant de l'hirudine**1. Souche et plasmide**

La souche décrite à l'exemple 1 a été utilisée.

Un plasmide dénommé p400 a été construit à partir du
 05 plasmide p373,2. Il porte une séquence d'ADN codant pour le variant
 (Lys⁴⁷)HV2 décrit dans EP-A-0273800 et dont la formule est ci-après
 rappelée :

10 ILE THR TYR THR ASP CYS THR GLU SER GLY GLN ASN LEU CYS LEU
 CYS GLU GLY SER ASN VAL CYS GLY LYS GLY ASN LYS CYS ILE LEU
 GLY SER ASN GLY LYS GLY ASN GLN CYS VAL THR GLY GLU GLY THR
 PRO LYS PRO GLU SER HIS ASN ASN GLY ASP PHE GLU GLU ILE PRO
 GLU GLU TYR LEU GLN

15 Un fragment synthétique AccI-HindIII (fragment 5)
 contenant une séquence codant pour ce variant (sauf les 3 premiers
 acides aminés) a été préparé. Il est représenté ci-dessous, une
 flèche désignant le codon correspondant au dernier acide aminé :

FRAGMENT 5

20

AccI

5' AT ACA GAC TGC ACA GAA TCG GGT
 TGT CTG ACG TGT CTT AGC CCA

25

CAA ATT TTG TGC CTC TGC GAG GGA AGC AAT
 GTT TTA AAC ACG GAG ACG CTC CCT TCG TTA

30

GTT TGC GGT AAA GGC AAT AAG TGC ATA TTG
 CAA ACG CCA TTT CCG TTA TTC ACG TAT AAC

GGT TCT AAT GGA AAG GGC AAC CAA TGT GTC
 CCA AGA TTA CCT TTC CCG TTG GTT ACA CAG

05 ACT GGC GAA GGT ACA CCG AAA CCT GAA AGC
TGA CCG CTT CCA TGT GGC TTT GGA CTT TCG

CAT AAT AAC GGC GAT TTC GAA GAA ATT CCA
GTA TTA TTG CCG CTA AAG CTT CTT TAA GGT

10 GAA GAA TAT TTA CAA TGA AAA ATG AAA GAA
CTT CTT ATA AAT GTT ACT TTT TAC TTT CTT

TAT CAA TCA TAG AGA ATT TTG ATT TGG GAA
ATA GTT AGT ATC TCT TAA AAC TAA ACC CTT

15 TTC GAA AAG TTC GCT GGT ACT AAG GCT TTG
AAG CTT TTC AAG CGA CCA TGA TTC CGA AAC

TTA GAC GAA GTT GTC AAG AGC TCT GCT GCT
AAT CTG CTT CAA CAG TTC TCG AGA CGA CGA

20 GGT AAC ACC GTC ATC ATT GGT GGT GGT GAC
CCA TTG TGG CAG TAG TAA CCA CCA CCA CTG

25 ACT GCC ACT GTC GCT AAG AAG TAC GGT GTC
TGA CGG TGA CAG CGA TTC TTC ATG CCA CAG

HindIII

ACT GAC AAG ATC CCA
TGA CTG TTC TAG GGT TCG A - 5'

30

Le plasmide p373,2 a été soumis à une digestion par les enzymes de restriction NdeI et HindIII et le fragment NdeI-HindIII (fragment 6) contenant l'origine de répllication, tel que représenté à la figure 3, a été purifié.

35

Un fragment synthétique NdeI-AccI (fragment 7) dont la séquence est donnée ci-dessous a été préparé.

NdeI

AccI

Ce fragment contient la séquence d'ADN préférée codant pour le peptide-signal selon l'invention délimitée par deux flèches et suivie de nucléotides correspondant aux 3 premiers codons du variant de l'hirudine (Lys⁴⁷)HV2.

15 Les fragments 5, 6 et 7 ont été ligués ; le plasmide obtenu est le plasmide p400.

2. Méthodologie générale

Le plasmide p400 a été introduit par transformation dans la souche bactérienne.

20 Les essais ont été réalisés en parallèle sur deux clones
distincts (clones p400,18 et p400,24) et conformément au mode opé-
ratoire décrit aux paragraphes 2.1 et 2.2. Les cultures ont été
induites selon la méthode indiquée au paragraphe 2.3 de l'exemple 1
mais en y apportant deux aménagements : l'induction a été initiée
25 par l'addition d'IPTG lorsque la culture a atteint une DO à 600 nm
d'environ 0,5 et elle a été maintenue pendant 3h30 pour un premier
essai et 17 h pour un second essai.

Après induction, les cellules ont été soumises à un choc osmotique (cf. § 2.4, exemple 1) et l'activité antithrombine de l'hirudine du surnageant recueilli a été mesurée.

La détermination de cette activité a fait appel à la technique décrite par Markwardt, F. et al. (Thromb. Haemostas. 52 (19) 160-163) et précisée par Harvey, R.P. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 1084-1088).

Le variant de l'hirudine obtenu à partir de l'un des clones a été purifié par chromatographie liquide haute pression et sa séquence NH_2 -terminale a été déterminée.

3. RESULTATS

Les résultats sont reportés sur le tableau ci-après.
Ils sont exprimés en unités antithrombine par ml de surnageant recueilli après choc osmotique et ramené à une turbidité telle que $\text{D}_{600} = 10$.

		Plasmide p 400	
		clone p400,18	clone p400,24
Durée de l'induction	3h,30	241	369
	17h	1595	983

Les valeurs d'activité antithrombine spécifique de l'hirudine connues étant comprises entre 13000 et 17700 unités antithrombine par mg d'hirudine (Loison, G. et al., Bio/Technology 6:72-77 (1988)), on peut en déduire que l'on a extrait après 17 h d'induction de 5 à 10 mg d'hirudine par litre de surnageant à $\text{D}_{600} = 1$.

Une telle quantité est bien plus élevée que celle que Dodt J. et al. FEBS, 202 (1986) 373-377 ont décrite avec le variant HV1 de l'hirudine produit de façon périplasmique dans une souche d'E. coli transformée à l'aide d'un plasmide portant une séquence codant pour un précurseur hybride de l'hirudine dont le peptide-signal est celui de la phosphatase alcaline.

Il a d'autre part été constaté que l'hirudine produite par le clone p400,18 a bien l'extrémité NH_2 -terminale caractéristique du variant (Lys^{47})HV2.

Ces résultats montrent que le peptide-signal selon l'invention est approprié à une production périplasmique efficace d'un peptide tel que le variant (Lys^{47})HV2 de l'hirudine.

REVENDICATIONS

1. Peptide-signal de formule :

MAPSGKSTLLLLFLLLCLPSWNAGA

05

où

A = Alanine	M = Méthionine
C = Cystéine	N = Asparagine
F = Phénylalanine	P = Proline
G = Glycine	S = Sérine
K = Lysine	T = Thréonine
L = Leucine	W = Tryptophane

10

2. Séquence d'ADN codant pour le peptide-signal selon la revendication 1.

15 3. Séquence selon la revendication 2, de formule :

5' ATG-GCT-CCA-TCT-GGC-AAA-TCC-ACG-CTG
 CTT-CTC-TTA-TTT-CTG-CTC-CTG-TGC-CTG
 CCC-TCT-TGG-AAC-GCC-GGC-GCT 3'

20 4. Vecteur d'expression portant une séquence d'ADN codant pour un précurseur d'un polypeptide, caractérisé en ce que la portion de cette séquence codant pour le peptide-signal est une séquence selon l'une des revendications 2 ou 3.

25 5. Procédé de production périplasmique d'un polypeptide consistant à transformer une souche de bactéries gram négatives par un vecteur d'expression portant une séquence d'ADN codant pour un précurseur dudit polypeptide, à cultiver lesdites bactéries de manière que, ladite séquence étant transcrite puis traduite, le polypeptide sous sa forme mature s'accumule dans le périplasme, caractérisé en ce que ledit vecteur est un vecteur selon la
 30 revendication 4.

6. Procédé de production d'hormone de croissance humaine selon la revendication 4.

35 7. Procédé de production d'hirudine selon la revendication 5.

8. Procédé de production du variant (Lys⁴⁷)HV2 de l'hirudine selon la revendication 5.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la souche de bactéries gram négatives est une souche E. coli.
- 05 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la souche E. coli porte une mutation cya par délétion et une mutation crp par délétion.

1/3

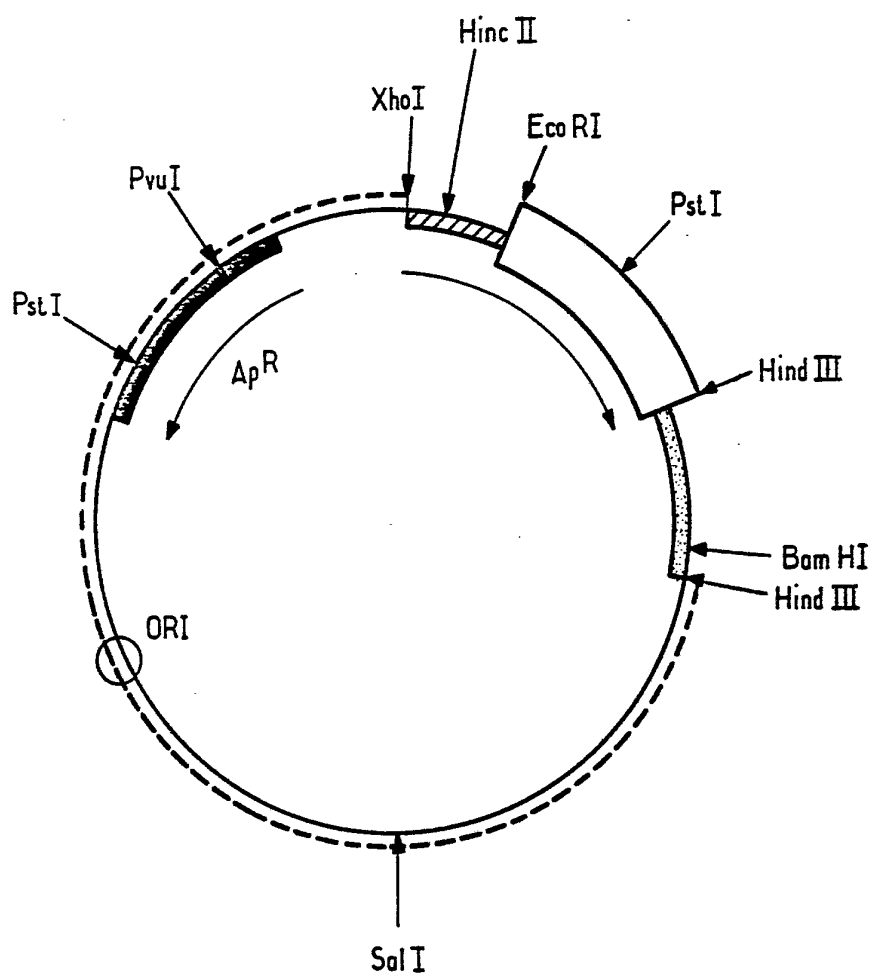


FIG.1

2/3

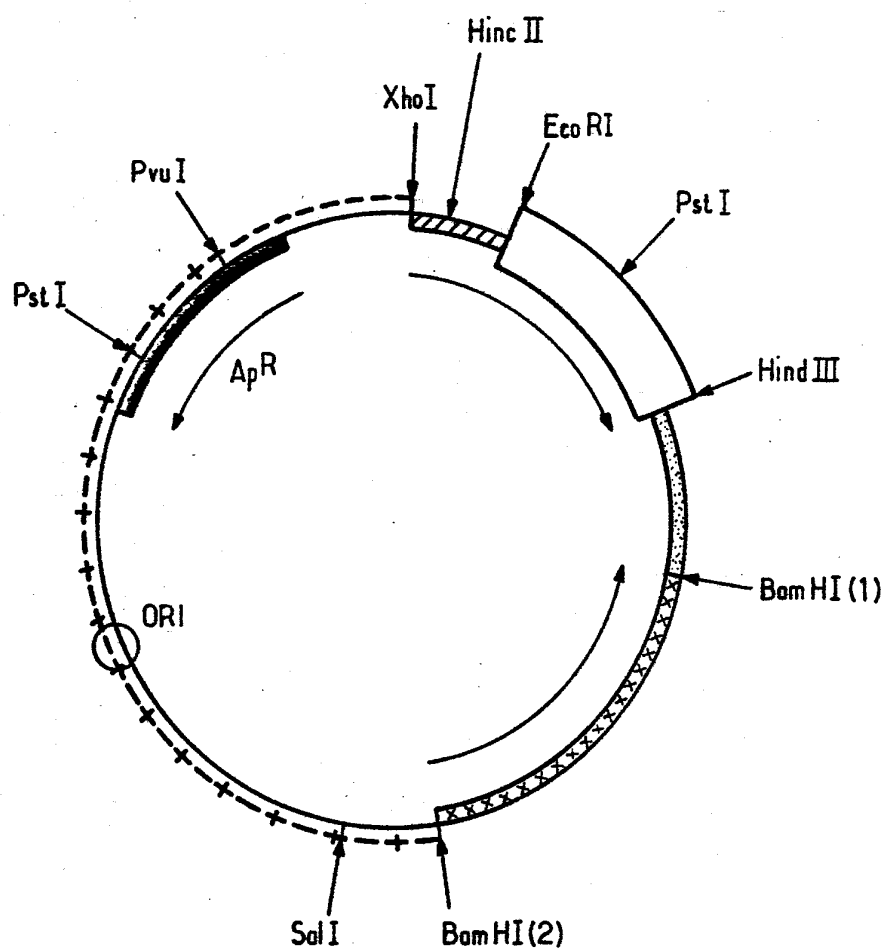


FIG.2

3/3

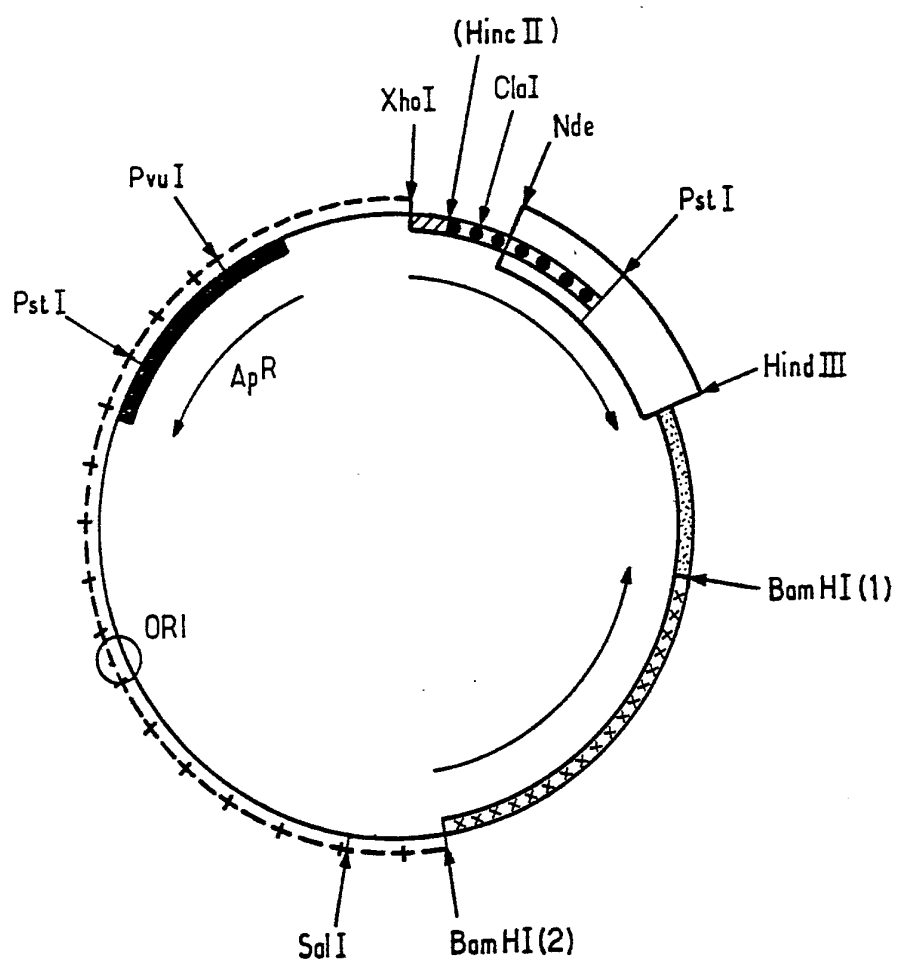


FIG.3