

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

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

2 567 540

②1 N° d'enregistrement national :

85 10816

⑤1 Int Cl⁴ : C 12 N 15/00; A 61 K 45/02; C 07 K 15/26 //
(C 12 N 15/00, C 12 R 1:38).

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15 juillet 1985.

③0 Priorité : SU, 13 juillet 1984, n° 3757952.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 3 du 17 janvier 1986.

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

⑦1 Demandeur(s) : *VSESOJUZNY NAUCHNO-ISSLEDOVA-
TELSKY INSTITUT GENETIKI I SELEKTSII PROMYSHLEN-
NYKH MIKROORGANIZMOV (VNIIGENETIKA) et INSTITUT
BIOORGANICHESKOI KHIMII IMENI M.M. SHEMYAKINA
AKADEMII NAUK SSSR. — SU.*

⑦2 Inventeur(s) : V. G. Debabov, J. D. Tsygankov, A. J.
Chistoserdov, E. D. Sverdlov, L. S. Izotova, S. V. Kostrov,
V. E. Sterkin, V. P. Kuznetsov, S. V. Belyaev, G. S.
Monastyrskaya, I. S. Salomatina, G. M. Dolganov, S. G.
Arsenian, S. A. Tsarev, J. I. Kozlov, A. Y. Strongin, V. I.
Ogarkov et J. A. Ovchinnikov.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Lavoix.

⑤4 Procédé de préparation d'un interféron leucocytaire humain alpha-2.

⑤7 L'invention concerne l'industrie microbiologique.

Un procédé d'obtention d'un interféron leucocytaire humain alpha-2 comprend une culture immergée d'une souche productrice contenant un plasmide avec un gène incorporé d'interféron leucocytaire humain alpha-2, sur un milieu nutritif contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, des sels minéraux et des agents de croissance, milieu soumis à l'aération en présence d'un antibiotique, avec isolement et purification subséquents du produit visé.

Dans le procédé, conforme à l'invention, on utilise comme souche productrice la souche *Pseudomonas species* VG-84 porteuse d'un plasmide pVG3, déposée dans la collection de cultures de micro-organismes de l'Institut pansoviétique de recherche scientifique des antibiotiques sous le numéro 1742, et la culture est réalisée en présence de streptomycine ou de tétracycline ou d'un mélange de ces antibiotiques. L'interféron leucocytaire humain alpha-2 présente une activité antivirale et trouve des applications en médecine.

FR 2 567 540 - A1

D

La présente invention concerne l'industrie microbiologique, et plus précisément, l'obtention d'un interféron leucocytaire humain alpha-2, doué d'une activité anti-virale et trouvant des applications en médecine pour la
5 prévention et le traitement d'un certain nombre de maladies courantes d'étiologie virale.

Les interférons sont des protéines synthétisées par certaines cellules de l'organisme humain en cas d'infection virale. Suivant le type de cellule productrice et
10 les particularités structurales et fonctionnelles des interférons, ces protéines sont divisées en trois groupes principaux: alpha ou leucocytaire (produit par les leucocytes) bêta ou fibroblastique (produit par les fibroblastes) et gamma ou immunitaire (produit par les lymphocytes T).
15

Outre l'activité anti-virale, les interférons présentent également une activité anti-proliférative et influent sur les réactions immunitaires. C'est ce qui permet de
20 considérer les produits médicamenteux à base d'interféron comme pouvant être efficaces contre certaines néoplasies malignes. On a obtenu ces derniers temps des interférons humains à haut degré de pureté, qui sont une famille de 13 à 15 protéines apparentées, dont chacune est codée par son propre gène dans le chromosome 9. Toutefois,
25 l'extraction de l'interféron leucocytaire dans le sang des donneurs ne peut assurer sa fabrication en quantités suffisantes pour son utilisation massive en clinique, car le taux d'interféron ne dépasse pas, en règle générale, 10^5 unités par litre de sang, alors que sa dose unique
30 efficace qu'on injecte par voie intra-veineuse doit constituer d'après les données cliniques disponibles, au moins 10^6 unités de l'activité.

On connaît déjà différents procédés de préparation d'interférons leucocytaires humains, reposant sur l'utilisation de diverses souches productrices, dans lesquelles
35 on incorpore, à l'aide de molécules vecteurs, des gènes individuels de l'interféron humain. On utilise notamment

comme souches productrices celles des bactéries Escherichia coli, Bacillus subtilis, Methylophilus methylotrophus, etc. (brevet européen EP n° 0 062 971 A2, publié en 1982, Cl. C 12N 15/00 .

5 Les micro-organismes contenant un plasmide avec un gène incorporé d'interféron leucocytaire humain produisent de l'interféron en les faisant incuber dans les conditions d'une culture immergée en aérobie, en contact des milieux nutritifs aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, des sels minéraux et des agents de croissance.

10 On connaît un procédé d'obtention d'un interféron leucocytaire humain alpha-2 (brevet de la Grande-Bretagne n°20792191A, publié en 1982, C 12N 15/00 souche-294, obtenue par incorporation d'un plasmide recombinant pLe IFA trp 2,5, dans lequel le gène d'interféron alpha-3 est placé sous le contrôle des régions régulatrices de l'opéron tryptophanique de E.coli.

20 On fait incuber la souche précitée dans les conditions d'une culture immergée, sur des milieux nutritifs aqueux contenant des sources de carbone et d'azote, des sels minéraux et des agents de croissance, en présence d'un antibiotique.

25 Pour ladite souche productrice, le rendement en interféron atteint $2,5 \times 10^8$ unités de l'activité par litre de liqueur de culture.

30 L'utilisation de E. coli comme souche productrice industrielle présente un certain nombre d'inconvénients. E. coli est un micro-organisme virtuellement pathogène et différentes souches de cette bactérie sont présentes en permanence dans la flore intestinale de l'homme. D'où les exigences particulièrement sévères imposées à la purification des produits obtenus à base de E.coli et la nécessité d'une séparation complète des protéines et endotoxines associées, ce qui rend beaucoup plus cher le procédé de fabrication de l'interféron et réduit le rendement en produit pur. En outre, toutes les souches de E. coli connues

dans la pratique des laboratoires sont sujettes à la phagolyse; le nombre de phages spécifiques identifiées pour *E.coli* se chiffre à plusieurs centaines.

Le procédé précité est caractérisé par une productivité
5 relativement peu élevée de la culture, ce qui fait que l'isolement de l'interféron dans la biomasse cellulaire et sa purification ultérieure jusqu'à un état homogène sont des opérations laborieuses.

On s'est proposé d'accroître le rendement en interfé-
10 ron leucocytaire humain alpha-2 et de simplifier son isolement par la mise en oeuvre d'une nouvelle souche productrice.

La solution consiste en ce que dans le procédé d'ob-
tention de l'interféron leucocytaire humain alpha-2 par
15 culture immergée d'une souche productrice contenant un plasmide porteur de gène d'interféron leucocytaire humain alpha-2 sur un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, des sels minéraux et des agents de croissance, milieu soumis à une
20 aération en présence d'un antibiotique, avec isolement et purification subséquents du produit visé on utilise, conformément, à l'invention, comme souche productrice la souche *Pseudomonas species* VG-84 porteuse d'un plasmide pVG-3 souche déposée dans la collection de cultures
25 de micro-organismes de l'Institut pansoviétique de recherche scientifique des antibiotiques sous le numéro 1742, et que la culture de la souche productrice est conduite en présence de streptomycine ou de tétracycline ou d'un mélange de ces antibiotiques. La tétracycline est
30 utilisée de préférence à raison de 30 à 50 mg par litre, et la streptomycine, de 50 à 150 mg par litre.

Le procédé revendiqué permet, grâce à la mise en
oeuvre de la souche hautement productive *Pseudomonas species* VG-84, d'accroître le rendement en produit visé et
35 de simplifier le procédé d'isolement de celui-ci. Le procédé en question met en oeuvre une nouvelle souche *Pseudomonas species* VG-84, dans laquelle le gène d'interféron leucocytaire humain alpha-2 est cloné dans la composition d'un plasmide polycopié pVG 3, et placé sous le contrôle

des régions régulatrices du gène D du bactériophage ϕ X174.

Le plasmide pVG 3 est un hybride moléculaire d'un plasmide vecteur polycopié pAYC34 ayant un large spectre d'hôtes et d'un plasmide pIFN- α 2-P2 contenant un réplicon pBR 322 et un gène d'interféron alpha-2 et déterminant la résistance des cellules à la tétracycline et à l'ampicilline. Dans le plasmide pIFN- α 2-P2, le gène d'interféron alpha-2 est placé sous le contrôle des régions régulatrices du gène D du bactériophage ϕ X174. Le plasmide vecteur pAYC34, d'une taille de 9 400 paires de nucléotides, appartient au groupe d'incompatibilité Inc p-4/Q et détermine la résistance des cellules à la streptomycine. L'ADN des plasmides pAYC34 et pIFN- α 2-P2 a été traité par de la restrictase Pst 1 et on a transformé les cellules compétentes de la souche E.coli C600 par un mélange allié. On a sélectionné les transformants sur un milieu nutritif contenant tous les constituants nécessaires et des antibiotiques: ampicilline (50 μ g/ml), streptomycine (100 μ g/ml) et tétracycline (25 μ g/ml). Dans les clones-transformants on a mis en évidence l'ADN de plasmide nommé pVG 3, qui, par sa taille et sa carte de restriction, correspond à un hybride des plasmides pAYC34 et pIFN- α 2-P2. Le plasmide pVG3 détermine la résistance des cellules à la streptomycine, comme le fait le plasmide pAYC34, et à la tétracycline et à l'ampicilline, comme le fait le plasmide pIFN- α 2-P2. La taille du plasmide pVG3 - 14 800 paires de nucléotides - est égale à la somme de tailles des plasmides pIFN- α 2-P2 (5 400 paires de nucléotides) et pAYC34 (9 400 paires de nucléotides).

Dans une souche E.coli C600 contenant un plasmide hybride pVG3 on a incorporé un plasmide de conjugaison R 751 ayant un large spectre d'hôtes. Dans une série de croisements de conjugaison, le plasmide pVG3 a été incorporé dans des bactéries du genre Pseudomonas et d'autres bactéries gram-négatives. Les bactéries trans-conjugantes ont été prélevées sur un milieu sélectionné spécial contenant les antibiotiques précités et on a vérifié leur aptitude à synthétiser l'interféron.

Les cultures obtenues par le procédé décrit ont été incubées pendant 6 à 10 h dans les conditions d'aérobiose à une température de 30°C, sur L-bouillon, jusqu'à l'obtention d'un titre de 2 à 5×10^9 cellules/ml. Les bactéries ont été prélevées par centrifugation, détruites à l'ultra-son et on a dosé l'interféron contenu dans les extraits cellulaires par la méthode radio-immunologique. On a ainsi testé 18 souches de bactéries gram-négatives des genres Escherichia, Salmonella, Pseudomonas, Methylo-
5 monas, Erwinia et Phizobium. La plupart des souches testées ont produit de l'interféron actif. La souche Pseudomonas sp. VG-84 s'est montrée la plus productive. Dans les conditions sus-indiquées, cette souche a produit 5×10^9 à 1×10^{10} unités d'interféron par litre de liqueur
10 de culture.

La présence dans la souche productive d'un plasmide à large spectre d'hôtes R751 détermine la synthèse des villosités spécifiques de plasmide qui constituent au collage des cellules et à leur agrégation rapide. La morphologie des cellules au cours de la fermentation et de la production d'interféron se modifie en donnant des cellules filiformes.
20

La souche Pseudomonas sp. VG-84 est déposée dans la collection de cultures de micro-organismes de l'Institut
25 Pansoviétique de recherche scientifique des antibiotiques sous le numéro 1742. Les caractéristiques culturelles et morphologiques de la souche Pseudomonas sp. VG-84 porteuse de plasmide pVG3 sont les suivantes:

30 Aspect visuel au microscope Bâtonnets mobiles gram-négatifs longs de 3 à $5 \mu\text{m}$

Morphologie sur divers milieux:

Gélose aux peptones

35

Au bout de 24 heures de croissance à une température de 25 à 30°C, forme des colonies aux bords sinueux de 3 à 4mm de diamètre, à surface rugueuse, d'une couleur vert clair.

Bouillon aux peptones

Au point de l'impact, ²⁵⁶⁷⁵⁴⁰ la croissance est modérée, essentiellement sur la surface du milieu. Sans aération, la croissance est faible.

Milieu minimal M9 au glucose

Au deuxième jour de la croissance, forme des colonies rondes de 2 à 3 mm de diamètre, rugueuses, d'une couleur grise.

Caractères physiologiques et biochimiques

La croissance est observée aux températures comprises entre 25 et 35°C (l'optimum se situe à 30°C), pH = 7,0. Le glucose et l'arabinose servent de sources de carbone. Assimile parfaitement l'azote. Nécessite une addition d'adénine. Résiste à la streptomycine et à la tétracycline. Forme un pigment fluorescent.

Le procédé revendiqué s'effectue de la manière suivante. On fait incuber la souche *Pseudomonas* sp. VG-84 pendant 8 à 12 heures et à une température de 28 à 30°C sur un milieu gélosé, après quoi on réensemence sur un milieu nutritif aqueux et on cultive la semence pendant 3 à 6 heures à une température de 28°C sous une agitation et une aération poussées. La fermentation est opérée dans un fermenteur sur un milieu nutritif aqueux quelconque contenant des sources de carbone et d'azote assimilables, des sels minéraux et des agents de croissance, notamment un milieu nutritif contenant du glucose, un extrait ou un autolysat de levure, ou de la tryptone, ou de la peptone, ou des hydrolysats de la caséine ou de levure, ou leur mélange. La fermentation est réalisée en présence de streptomycine ou de tétracycline ou d'un mélange de ces antibiotiques. On utilise de préférence la tétracycline à raison de 30 à 50 mg/litre, et la streptomycine, de 50 à 150 mg/litre. La fermentation s'effectue pendant 6 à 10 heures, à une température de 28 à 32°C et à pH de 6,7 à 7,1, sous une aération poussée. Lors de la fermentation, on mesure la densité optique

A₅₅₀ de la suspension bactérienne, dont la valeur atteint 5 à 7 unités vers la fin de la fermentation.

5 Pour le procédé décrit, le rendement en interféron représente d'après les données d'analyse radio-immunologique ou de la détermination de l'activité anti-virale dans des cultures de fibroblastes humains, 5×10^9 à $1,5 \times 10^{10}$ unités par litre de liqueur de culture.

10 A l'issue de la fermentation, et la densité optique indiquée étant atteinte, les cellules bactériennes sont prélevées par centrifugation, remises en suspension dans une solution tampon convenable et détruites à l'ultra-son ou par n'importe quelle autre méthode entraînant la destruction des cellules ou la perturbation de la continuité des membranes cellulaires, telle que le traitement par du
15 lysozyme, des billes de verre ou de métal, par compression, etc. Les fragments de cellules sont séparés par centrifugation et on isole dans le liquide surnageant, présentant un extrait de cellules, l'interféron qu'il contient, par des méthodes connues de fractionnement et de
20 purification des protéines. Le rendement en interféron homogène quant à ses caractéristiques physico-chimiques différentes va de 20 à 60%, le degré de purification étant compris entre 200 et 500 et l'activité spécifique du produit résultant de la purification étant de 4×10^8
25 unités de l'activité. L'opération de purification est contrôlée en déterminant l'activité anti-virale de l'interféron sur des cultures de fibroblastes humains infectés du virus de la stomatite vésiculaire et par analyse radio-immunologique ou immuno-enzymatique. La pureté des
30 préparations d'interféron est contrôlée par des méthodes immunologiques, électrophorétiques, de filtration sur gel et de sédimentation, ainsi qu'en identifiant les acides aminés qui le composent et en déterminant la séquence des acides aminés en bout N de la molécule. L'interféron
35 leucocytaire humain alpha-2 obtenu est homogène et présente tous les caractères structuraux et fonctionnels propres à ce type d'interféron.

L'avantage du procédé revendiqué par rapport au procédé connu consiste en ce que, grâce à la mise en oeuvre d'une souche hautement productive, on obtient une activité élevée au stade de fermentation, ce qui fait qu'une même quantité d'interféron peut être obtenue à partir d'un moindre volume de biomasse, d'où une réduction des frais pour l'isolement de la biomasse, de sa désintégration et de toutes les opérations subséquentes visant à obtenir un produit homogène.

10 D'après les données d'une séquence automatique selon Edmann, l'interféron homogène isolé dans la biomasse de la souche productrice *Pseudomonas* sp. VG-84 présente une séquence des acides aminés en bout N Cys-Asp-Leu-Pro-Glu-Thr-His-Sér... et ne contient pas en bout N de résidu
15 de méthionine, ce qui le fait, du point de vue structural, parfaitement identique à l'interféron alpha-2 produit par les leucocytes de l'homme.

Pour mieux faire comprendre la présente invention, on donne les exemples suivants d'exécution du procédé d'obtention de l'interféron leucocytaire humain alpha-2.
20

Exemple 1

On fait croître la souche *Pseudomonas* sp. VG-84 pendant 12 heures à 28°C sur une gélose inclinée de la composition suivante par litre: 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 80 mg d'adénine, 10 g de glucose, 150 mg
25 de streptomycine, 50 mg de tétracycline, 15 g de gélose, le reste étant de l'eau distillée (jusqu'à un litre). La biomasse obtenue sur le milieu incliné sert de matériel de semence. On la transvase dans des flacons Erlenmeyer
30 de 750 ml contenant 100 ml du milieu indiqué (sans gélose) et on cultive pendant 6 heures sur une secoueuse rotative sous une agitation poussée (240 tr/mn) et à une température de 28°C. La densité optique de la culture d'ensemencement est de 2 unités.

35 La culture s'effectue dans un fermenteur doté de systèmes de régulation de la température, du pH, de la vitesse d'agitation et de l'aération, d'un capteur pour mesurer

la pression partielle de l'oxygène dissous. A cet effet, on introduit la semence, à raison de 5%, dans le fermenteur contenant un milieu nutritif aqueux de la composition sus-indiquée (sans gélose) et on fait incuber pendant 6 heures
5 à une température de $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ et à un pH de 6,7 à 6,9 sous une aération et une agitation poussées.

Le régime d'aération et d'agitation est choisi de façon que la croissance de la culture ne soit pas limitée par la concentration d'oxygène dissous. A cette fin, la
10 pression partielle de l'oxygène est maintenue à un niveau de 5 à 10% de la saturation. Pour la stabilisation du pH, on utilise de l'eau ammoniacale.

La propagation de la biomasse est contrôlée en mesurant toute une heure la densité optique de la liqueur
15 de culture. On arrête la fermentation lorsque la densité optique A_{550} atteint 5 unités.

A l'issue de la fermentation, la concentration d'interféron leucocytaire humain alpha-2 constitue $1,5 \times 10^{10}$ unités de l'activité par litre de liqueur de culture. Pour
20 déterminer la concentration de l'interféron obtenu, on fait appel à une modification de phase solide de l'analyse radio-immunologique avec utilisation d'anticorps polyclonaux anti-interféron du lapin et d'anticorps monoclonaux de la souris, marqués à l'iode-125, et on détermine
25 aussi l'activité anti-virale de l'interféron d'après l'effet protecteur qu'il exerce contre l'action cytopathique du virus de la stomatite vésiculaire dans les cultures de fibroblastes humains diploïdes. Comme produit de référence, on utilise de l'interféron normalisé MRC B69/19
30 (Grande-Bretagne).

Les cellules récoltées par centrifugation à l'issue de la fermentation sont utilisées comme source d'interféron. Les cellules sont mises en suspension dans une solution tampon tris 0,1 M à un pH = 7,5, à raison de 1 g
35 de cellules par 5 à 10 ml de solution tampon puis on brise les cellules dans un désintégrateur ultrasonique. Les fragments des cellules sont séparés par centrifugation à

30 000 g et on isole dans le liquide surnageant (extrait cellulaire) l'interféron leucocytaire humain alpha-2.

On obtient par purification un interféron leucocytaire humain alpha-2 électrophorétiquement homogène, le 5 degré de purification étant de 210 et le rendement, en calculant en activité, de 41%. Le produit final a une activité unitaire de $4,0 \times 10^8$ unités. Les résultats de l'analyse électrophorétique de l'interféron leucocytaire humain alpha-2 sont présentés sur le dessin, où A est 10 l'interféron avant la purification, B, l'interféron après la purification, la masse moléculaire des protéines standards en kD figurant à droite (l'électrophorèse est effectuée dans un gel de polyacrylamide à 12,5% en présence de dodécylsulfate de sodium). En ce qui concerne l'activité 15 spécifique, la masse moléculaire (18,4 kD), la composition en acides aminés et d'autres indices, l'interféron leucocytaire humain alpha-2 ainsi isolé ne diffère pas de l'interféron leucocytaire humain alpha-2 extrait d'autres souches bactériennes productrices.

20 Exemple 2

Le procédé est réalisé comme dans l'exemple 1. La culture est effectuée en présence de streptomycine (50 mg/litre) et de tétracycline (30 mg/litre). Au bout de 6 heures de fermentation, la densité optique de la 25 suspension bactérienne est égale à 4,2 unités et la teneur en interféron leucocytaire humain alpha-2 représente $7,5 \times 10^9$ unités par litre de liqueur de culture.

Exemple 3

Le procédé est réalisé comme dans l'exemple 1. La 30 culture est effectuée en présence de tétracycline (50 mg/litre).

Au bout de 5,5 heures de fermentation, la densité optique de la suspension bactérienne est égale à 5,5 unités et la teneur en interféron d'un litre de liqueur de 35 culture représente $9,5 \times 10^9$ unités.

REVENDICATIONS

1° Procédé d'obtention d'un interféron leucocytaire
humain alpha-2 par culture immergée d'une souche pro-
ductrice contenant un plasmide avec un gène incorporé d'in-
5 terféron leucocytaire humain alpha-2, sur un milieu nu-
tritif contenant des sources assimilables de carbone et
d'azote, des sels minéraux et des agents de croissance,
milieu soumis à l'aération et en présence d'un anti-bio-
tique, avec isolement et purification subséquents du
10 produit visé, procédé c a r a c t é r i s é en ce qu'à
titre de souche productrice on utilise la souche Pseudo-
monas species VG-84 porteuse d'un plasmide pVG 3, déposée
dans la collection de cultures de micro-organismes de l'In-
stitut pansoviétique de recherche scientifique des anti-
15 biotiques sous le numéro 1742, et que la culture est réa-
lisée en présence de streptomycine ou de tétracycline
ou de leur mélange.

2° Procédé selon la revendication 1° , c a r a c -
t é r i s é en ce qu'on utilise de la tétracycline à
20 raison de 30 à 50 mg par litre et de la streptomycine
à raison de 50 à 150 mg par litre.

