

La présente invention concerne généralement le clonage et l'expression du facteur de croissance transformant humain beta2.

5 Dans ce domaine technique, on sait que le facteur de croissance transformant beta (TGF- β) est un membre d'une famille décrite récemment de polypeptides qui règlent la différenciation et la prolifération cellulaires. D'autres membres de cette famille comprennent la substance inhibitrice de Muller (Cate et al, 1986, Cell 45:685-698), les inhibines (Mason et al, 10 1985, Nature 318:659-663) et une protéine prédite à partir d'un transcrit du complexe de gène décapentaplégique de la drosophile (Padgett et al, 1987, Nature 325:81-84)

15 Le facteur de croissance transformant Beta (TGF- β) consiste en deux sous-unités identiques liées par ponts disulfures ayant des poids moléculaires de 13 000 (Assoian et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:7155-7160 ; Frolik et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 20 80:3676-3680; Frolik et al. 1984, J. Biol. Chem. 260:10995-11000). Il a été purifié à partir de plusieurs sources de tissu y compris le placenta (Frolik et al., 1983, Nature 325:81-84), les plaquettes sanguines (Childs et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5312-5316 ; 25 Assoian et al., 1983; J. Biol. Chem. 258: 7155- 7160), le rein (Roberts et al., 1983, Biochemistry 22:5692-5698), et d'os déminéralisés (Seyedin et al. , 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:119-123). En présence de sérum à 10% et de facteur de croissance épidermique, TGF- β favorise la 30 croissance indépendante de l'ancrage de fibroblastes de reins de rats normaux (Roberts et al., 1981, Proc Natl. Acad. Sci. USA 78:5339-5343; Roberts et al., 1982, Nature 295:417-419 ; Twardzik et al., 1985, J. Cell. Biochem. 28:289-297) ; en présence de sérum à 10% seul, il est 35 capable d'induire la formation de colonies de

fibroblastes AKR-2B (Tucker et al. 1983, Cancer Res. 43:1518- 1586). TGF- β s'est aussi révélé causer la différenciation de cellules de mésenchyme de muscles de foetus de rat pour produire des macromolécules spécifiques du cartilage (Seyedin et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:5693-5695).

En contraste avec son effet sur la prolifération cellulaire, TGF- β purifié à partir de plaquettes humaines de même qu'une protéine apparentée du point de vue fonctionnel isolée à partir de cellules de callitriche africain (BSC-1) s'est révélé inhiber la croissance de certaines cellules en culture (Tucker et al., 1984, Science 226:705-707). TGF- β s'est aussi révélé inhiber la croissance de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines (Roberts et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:119-123). Cet effet inhibant/stimulant de TGF- β peut dépendre de plusieurs facteurs y compris le type cellulaire et l'état physiologique des cellules (pour un compte rendu voir Sporn et al., 1986, Science 233:532-534).

Des clones d'ADNc codant pour TGF- β humain (Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705), murin (Derinck et al., 1986, J.Biol. Chem. 261:4377-4379) et simien (Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) ont été isolés. L'analyse des séquences d'ADN de ces clones indique que TGF- β est synthétisé sous forme d'un polypeptide précurseur de grande taille, dont l'extrémité carboxy est clivée pour former le monomère mature de TGF- β . Une forte homologie de séquences a été trouvée dans toute la protéine précurseur de TGF- β provenant de toutes les sources ci-dessus.

Très récemment, une protéine isolée à partir d'os bovins déminéralisés a été identifiée comme étant apparentée à TGF- β (Seyedin et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:1946-1949). La protéine a également été isolée à

partir de plaquettes de porc (Cheifetz et al., 1987, Cell
48:409-415), d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome de
la prostate humain, PC-3 (Ikeda et al., 1987, Biochemis-
try 26:2406- 2410), et d'une lignée cellulaire de glio-
5 blastome humain (Wrann et al., 1987, EMBO 6:1633-1636).
Une séquence partielle d'acides aminés de cette protéine
indiquait qu'elle était homologue de TGF- β et a été
dénommée TGF- β 2. Le TGF- β humain (Derynck et al., 1985,
Nature 316:701-705), murin (Derynck et al., 1986, J.
10 Biol. Chem. 261:4377-4379) et simien (Sharples et al.,
1987, DNA 6:239-244) décrit précédemment a été dénommé
TGF- β 1.

La présente invention a pour objet la
production de grandes quantités de TGF- β 2 par des
15 cellules hôtes eucaryotes transfectées par des vecteurs
d'ADN recombinant contenant une séquence codant pour
TGF- β 2 contrôlée par des éléments régulateurs
d'expression. Dans un mode de réalisation spécifique, des
clones d'ADNc codant pour le précurseur de TGF- β 2 humain
20 ont été obtenus à partir d'une bibliothèque d'ADNc
constituée à partir d'une lignée cellulaire
d'adénocarcinome de la prostate humain traitée au
tamoxifen, PC-3. La séquence d'ADNc d'un tel clone prédit
que TGF- β 2 est synthétisé sous forme d'un précurseur de
25 polypeptide de 442 acides aminés duquel est dérivée la
sous-unité mature de TGF- β 2 de 112 acides aminés par un
clivage protéolytique. Ce précurseur de TGF- β 2, dénommé
TGF- β 2-442, partage une homologie de 41% avec le
précurseur de TGF- β 1. Dans un autre mode de réalisation,
30 des clones d'ADNc codant pour le précurseur de TGF- β 2
simien ont été obtenus à partir d'une bibliothèque d'ADNc
constituée à partir d'une lignée cellulaire de rein de
callitriche africain, BCS-40. La séquence d'ADNc d'un tel
clone prédit que TGF- β 2 est également synthétisé sous
35 forme d'un précurseur de polypeptide de 414 acides aminés

duquel est dérivée la sous-unité mature de TGF- β 2 de 112 acides aminés par clivage protéolytique. Ce précurseur de TGF- β 2, dénommé TGF- β 2-414, a une séquence d'acides aminés de 414 résidus d'acides aminés et est identique à la séquence d'acides aminés de TGF- β 2-442, excepté qu'il contient un seul résidu d'asparagine au lieu de la séquence de 29 acides aminés des résidus No. 116 à 135 de la séquence de TGF- β 2-442 humain.

Des clones provenant de la bibliothèque d'ADNc de BSC-40 qui codent pour un précurseur de TGF- β 2-442 simien de même que des clones provenant de la bibliothèque d'ADNc de PC-3 humain qui codent pour un précurseur de TGF- β 2-414 humain ont également été identifiés. Les précurseurs de TGF- β 2-442 humain et simien paraissent être parfaitement homologues au niveau des acides aminés, comme le sont les précurseurs de TGF- β 2-414 humain et simien.

Les monomères matures de 112 acides aminés de TGF- β 1 et TGF- β 2 montrent 71 % d'homologie.

Des vecteurs d'expression contenant la séquence mature codant pour TGF- β 2 jointe en phase aux séquences de signal et précurseur de TGF- β 1 (demande de brevet US en instance et en co-propriété No. 189 984) ont été construits et utilisés pour transfecter des cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO). Les transfectants de CHO résultants produisent et secrètent un TGF- β 2 mature, biologiquement actif.

Les termes suivants tels qu'utilisés ici au singulier ou au pluriel ont les significations indiquées.

TGF- β 2 : un facteur de croissance transformant β 2 d'origine humaine ou simienne comprenant la séquence d'acides aminés sensiblement telle que représentée à la figure 1a

depuis environ le reste d'acide aminé No. 331 jusqu'à environ le reste d'acide aminé 442.

Précurseur

5 de TGF- β 2 : Une famille de molécules de
facteur de croissance transformant
10 β 2 d'origine humaine ou simienne
comprenant une séquence d'acides
aminés sensiblement telle que
représentée à la figure 1a depuis
environ le résidu d'acide aminé
No. 1 jusqu'à environ le résidu
d'acide aminé No.442 dans laquelle
15 la séquence d'acides aminés depuis
le résidu d'acide aminé No. 116
jusqu'au résidu d'acide aminé
No. 144 est supprimée et remplacée
par un seul résidu d'asparagine.
Le terme signifie un précurseur de
20 TGF- β 2 désigné TGF- β 2-442 ou
TGF- β 2-414 d'origine humaine ou
simienne.

Précurseur

25 de TGF- β 1/
TGF- β 2
hybride : Nouvelle molécule de précurseur
de facteur de croissance transfor-
mant β comprenant la séquence
d'acides aminés sensiblement telle
30 que représentée à la figure 1b
depuis environ le résidu d'acide
aminé No. 1 jusqu'à environ le
résidu d'acide aminé No. 390.

Précurseur

de TGF- β 1 : Séquences de précurseur et de
signal du facteur de croissance
transformant β 1 simien sensible-
ment telle que représentée à la
figure 1b depuis environ le résidu
d'acide aminé No.1 jusqu'à environ
le résidu d'acide aminé No. 278.

Les caractéristiques et avantages de l'inven-
tion apparaîtront mieux dans la description détaillée qui
va suivre et qui se réfère aux figures annexées données à
titre d'exemple, dans lesquelles :

- la figure 1a représente la séquence
nucléotidique d'ADNc de TGF- β 2-442 humain et la séquence
d'acides aminés déduite ; la séquence d'insertion bp 2597
de PC-21 a été sous-clonée dans pEMBL (Dante et al.,
1983, Nucleic Acids Res. 11:1645-1654) et séquencée sur
les deux brins à l'aide de la réaction de terminaison au
didésoxy nucléotide (Sanger et al., 1977, Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 74:5463-5467) ; la séquence codante est
montrée et la séquence d'acides aminés déduite est
présentée directement au-dessus ; la séquence de TGF- β 2
mature est encadrée et le peptide signal est surmonté
d'un trait ; les sites de glycosylation potentielle sont
indiqués par des astérisques ; la flèche indique le site
préssumé de clivage de la séquence signal ; la séquence
nucléotidique de l'ADNc de TGF- β 2-414 simien est
identique à la séquence d'ADNc de TGF- β 2-442 humain
excepté que les nucléotides 346 à 432 (entre crochets)
sont supprimés et remplacés par la séquence AAT, et
excepté que plusieurs changements silencieux de
nucléotides ont lieu ailleurs dans la structure (ceci est
indiqué par des lettres isolées directement au-dessous du
nucléotide modifié) ; la séquence d'acides aminés déduite

pour le précurseur de TGF- β 2-414 simien est identique à la séquence d'acides aminés de précurseur de TGF- β 2-442 humain sauf que l'asparagine remplace les restes d'acides aminés 116 à 144 dans la structure de TGF- β 2-442 humain ;
5 la séquence nucléotidique d'un ADNc de TGF- β 2-414 humain a été séquencée dans la région soulignée en traits interrompus et s'est révélée parfaitement homologue de la séquence d'ADNc de TGF- β 2-442 humain mis à part que les nucléotides 346 à 432 sont supprimés et remplacés par la
10 séquence AAT ;

- la figure 1b représente la séquence nucléotidique d'ADN précurseur de TGF- β 1/TGF- β 2 hybride et la séquence d'acides aminés déduite ; la séquence codante est montrée et la séquence d'acides aminés déduite est
15 présentée directement au-dessus ; la séquence de TGF- β 2 mature est encadrée et le peptide signal précurseur est surmonté d'un trait. Les sites de glycosylation sont indiqués par des astérisques ; la flèche indique le site présumé de clivage de la séquence signal. La séquence de
20 codage mature de TGF- β 2 décrite est d'origine humaine. La séquence de codage mature de TGF- β 2 simien est à peu près identique à la séquence humaine : seuls trois changements silencieux de bases ont lieu et sont indiqués par des lettres isolées directement au-dessous du nucléotide
25 modifié ; les détails du clonage par ADNc de TGF- β 2 et la construction du gène TGF- β 1/TGF- β 2 hybride sont donnés dans le texte ;

- la figure 1c représente un diagramme schématique du gène précurseur de TGF- β 1/TGF- β 2 hybride ;

30 - la figure 1d représente les sites de l'endonucléase de restriction de pPC-14 (2,2 kb) et pPC-21 (2,3 kb); les régions encadrées indiquent les séquences de codage pour le monomère de TGF- β 2 ; ATG représente le codon de méthionine d'initiation; la

distance entre ATG et le site KpnI dans pPC-21 (2,34 kb) est d'approximativement 420 bp ; la zone noircie indique la position de l'insertion de 84 bp dans pPC-21 (2,3 kb);

- la figure 1e représente une analyse partielle
5 de séquences d'ADN de pPC-14 (2,2 kb) ; un oligonucléotide synthétique 5'-AGGAGCGACGAAGAGTACTA-3' qui s'hybridait approximativement 140 bp en amont du site KpnI à l'intérieur de la séquence d'insertion dans pPC-21 (2,3 kb) a été utilisé pour amorcer les réactions de
10 séquençage d'ADN ; dans cette région, la séquence de pPC-14 (2,2 kb) (ligne supérieure) est identique à pPC-21 (2,3 kb) jusqu'aux nucléotides codant pour Asn-116 ; l'insertion de 84 bp à l'intérieur du codon Asn-116 de pPC-14 (2,2 kb) qui a été trouvée dans pPC-21 (2,3 kb)
15 est montrée ; le site KpnI à l'intérieur de la séquence d'insertion est représenté ;

- la figure 2 représente des homologies de séquences de précurseurs de TGF- β 1 et TGF- β 2-442 humain ;
a) homologie primaire de séquences : les résidus identiques sont encadrés ; les astérisques désignent les sites
20 potentiels de glycosylation dans TGF- β 2 ; le site potentiel de clivage de la séquence signal et le site de clivage du polypeptide mature sont indiqués ; b) comparaison de matrices de points à l'aide du logiciel Gene
25 Pro; chaque point localise un point où 5 acides aminés sont identiques parmi 10 acides aminés ; les lignes en diagonale indiquent les régions d'homologie ;

- la figure 3 représente une analyse au Northern blot de l'ARN polyadénylé de BSC-40 et de PC-3 ;
30 l'ARN polyadénylé a été isolé à partir de cellules de BSC-40 et de PC-3, fractionné sur un gel agarose-formaldéhyde, transféré sur des filtres Hybond-N et hybridé avec une sonde spécifique de TGF- β 2 marquée au [32 P], avec pPC-21 (partie A) ou un mélange de sondes
35 spécifiques de TGF- β 1 et TGF- β 2 marquées au [32 P] (partie

B) (Sharples et al., 1987) comme décrit dans la partie des matériaux et méthodes ; bande 1, ARN polyadénylé de BSC-40 (5 microgrammes) ; bande 2, ARN polyadénylé de PC-3 (5 microgrammes) ;

5 - la figure 4 représente une analyse au Northern blot d'ARN polyadénylé provenant de différentes sources ; l'ARN polyadénylé a été isolé à partir de cellules de MCF-7 (carcinome mammaire humain), de SK-MEL 28 (mélanome humain), de KB (carcinome nasopharyngien) et
10 de HBL-100 (épithélium mammaire humain) et analysé par hybridation au Northern blot avec une sonde spécifique de TGF- β 2 (pPC-21) comme décrit dans la partie matériaux et méthodes ; chaque bande contient 5 microgrammes d'ARN polyadénylé provenant de cellules de SK-MEL 28 (bande 1),
15 de MCF-7 (bande 2), de HBL-100 (bande 3) ou de KB (bande 4) ;

 - la figure 5 correspond à un test de bioactivité de TGF- β 2 recombinant ; des cellules ovariennes de hamster chinois de clone 36 de 1B9 portant pSV/beta 1 - beta 2/dhfr dont la lignée cellulaire a été déposée à l'ATCC (American Type Culture Collection) sous le numéro d'accès CRL 9800, ont été cultivées jusqu'à la confluence dans des bacs de culture de tissus de 100 mm ;
20 les cellules ont été lavées trois fois avec un milieu dépourvu de sérum et ont été mises à incuber pendant 24 heures dans 5 ml de milieu dépourvu de sérum ; le milieu a été recueilli, dialysé contre de l'acide acétique 0,2M, et testé concernant l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les cellules de CCL64 comme décrit (Gentry et al.,
25 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418). Dans ce test, 3,3 pg de TGF- β 1 purifié naturel standard ont donné 50 % d'inhibition ; l'activité spécifique du TGF- β 2 purifié naturel a été calculée : elle était environ la moitié de celle de TGF- β 1 ; et
30

- la figure 6 représente une analyse au Western blot de protéines recombinantes secrétées par des cellules ovariennes de hamster chinois de clone 36 de 1B9 portant pSV/beta 1 -beta 2/dhfr dont la lignée cellulaire a été déposée à l'ATCC (American Type Culture Collection) sous le numéro d'accès CRL 9800 ; un milieu conditionné dépourvu de sérum dialysé à l'acide provenant de cellules du clone 36 de 1B9, a été fractionné par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide et analysé par Western blot avec un anti-sérum préparé contre le peptide synthétique NH₂-YNTINPEASASPC-COOH comme décrit (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418).

La présente invention concerne la production d'une forme mature biologiquement active de TGF- β 2 à partir d'une séquence codante du gène précurseur de TGF- β et son produit. Le TGF- β 2 mature biologiquement actif peut être produit par le clonage et l'expression de toute la longueur de la séquence de codage du nucléotide du précurseur de TGF- β 2 ou de son équivalent fonctionnel dans une cellule hôte qui transforme correctement le précurseur de sorte qu'est produit un TGF- β 2 mature ayant une activité biologique qui virtuellement ne peut pas être distinguée de celle du TGF- β 2 naturel authentique. Les équivalents fonctionnels de la longueur totale de la séquence de codage du nucléotide du précurseur de TGF- β 2 comprennent toute séquence d'ADN qui, lorsqu'elle est exprimée à l'intérieur d'une cellule hôte appropriée, est capable de diriger la synthèse, la transformation et l'export de TGF- β 2 mature. A cet égard, des séquences de codage de précurseur hybride incluant par exemple la séquence de précurseur de TGF- β 1 dans le cadre de lecture de la séquence mature de TGF- β 2, peuvent être construites et utilisées pour produire un TGF- β 2 biologiquement actif. Le procédé selon l'invention peut être divisé en les étapes suivantes dans un but de description uniquement : (a) isolement ou production de la séquence

de codage pour une forme de précurseur de TGF- β 2 ; (b) construction d'un vecteur d'expression qui va diriger l'expression d'une séquence de codage de TGF- β 2 ; (c) transfection de cellules hôtes appropriées qui sont
5 capables de répliquer et d'exprimer le gène et de transformer le produit du gène pour produire la forme mature biologiquement active de TGF- β 2 ; (d) identification et purification du TGF- β 2 mature biologiquement actif. Le transfectant qui exprime des
10 niveaux élevés de TGF- β 2 mature bioactif étant identifié, la pratique de l'invention inclue l'expansion de ce clone et l'isolement du produit de gène exprimé.

Le procédé de l'invention est démontré ici au moyen d'exemples dans lesquels des ADNc de la région de
15 codage du précurseur de TGF- β 2 ont été préparés, clonés, séquencés et utilisés pour construire des vecteurs d'expression qui dirigent l'expression à niveau élevé de TGF- β 2 dans des cellules de CHO. Dans un mode de réalisation spécifique, la séquence d'acides aminés
20 complète de la forme mature du TGF- β 2 humain a été déterminée et présente une homologie globale de 71 % avec TGF- β 1. A l'aide de sondes d'oligonucléotides synthétiques nous avons identifié les clones provenant d'une bibliothèque d'ADNc de PC 3 codant pour TGF- β 2.
25 L'analyse de séquences d'ADN de l'un de ces clones a révélé que le TGF- β 2, de même que le TGF- β 1, est synthétisé sous forme d'une protéine de précurseur de plus grande taille, dont l'extrémité carboxy est clivée pour produire le monomère de TGF- β 2 mature. Tandis qu'il
30 y a une homologie de 71 % entre TGF- β 1 et TGF- β 2 d'un bout à l'autre des portions matures de ces molécules, il existe seulement un maximum de 31 % d'homologie dans le reste du précurseur, ce qui suggère que les régions d'extrémité amine de TGF- β 1 et TGF- β 2 peuvent être
35 distinctes du point de vue fonctionnel.

Dans un mode de réalisation spécifique de l'invention, l'expression d'un nouveau gène hybride de TGF- β 1/TGF- β 2 dans des cellules de CHO est utilisée pour produire de grandes quantités de TGF- β 2 biologiquement actif. Les différents aspects du procédé de l'invention sont décrits plus en détails dans les sous-sections suivantes et dans les exemples qui suivent.

La séquence de codage du nucléotide pour TGF- β 2 est représentée à la figure 1a. Dans la pratique du procédé de l'invention, la séquence du nucléotide représentée ici, ou des fragments ou des équivalents fonctionnels de celle-ci, peut être utilisée pour produire les molécules recombinantes qui vont diriger l'expression du produit de TGF- β 2 dans des cellules hôtes appropriées. Dans un mode de réalisation spécifique, un gène hybride de TGF- β 1/TGF- β 2 (figure 1b) a été construit et utilisé pour transférer des cellules de CHO. Des transfectants produisant une quantité aussi importante que 500 μ g de TGF- β 2 mature biologiquement actif par ml de milieu de culture ont été isolés.

Du fait de la dégénérescence des séquences de codage de nucléotide, d'autres séquences d'ADN qui codent sensiblement pour les mêmes séquences d'acides aminés que celles représentées à la figure 1a et la figure 1b peuvent être utilisées dans la pratique de la présente invention pour le clonage et l'expression de TGF- β 2. De telles modifications comprennent les délétions, les additions ou les substitutions de différents résidus de nucléotides ayant pour résultat une séquence qui code pour le même produit de gène ou pour un produit de gène équivalent du point de vue fonctionnel. Le produit de gène peut contenir des délétions, des additions ou des substitutions de restes d'acides aminés dans la séquence, ce qui a pour résultat une modification silencieuse produisant ainsi un produit bio-actif. De telles

substitutions d'acides aminés peuvent être réalisées sur la base de similarité de polarité, de charge, de solubilité, d'hydrophobicité, hydrophilicité et/ou de nature amphipathique des résidus impliqués. Par exemple, les acides aminés chargés négativement comprennent l'acide aspartique et l'acide glutamique ; les acides aminés chargés positivement comprennent la lysine et l'arginine ; les acides aminés comportant des groupes de tête polaires non chargés ou des groupes de tête non polaires ayant des valeurs semblables d'hydrophilicité comprennent les suivants : leucine, isoleucine, valine; glycine, alanine; asparagine, glutamine; sérine, thréonine; phénylalanine, tyrosine.

la séquence de codage de nucléotide pour TGF- β 2 peut être obtenue à partir de sources cellulaires qui produisent une activité semblable à TGF- β 2. La séquence de codage peut être obtenue par clonage par ADNc d'ARN isolé et purifié à partir de telles sources cellulaires ou par clonage génomique. L'ADNc ou les bibliothèques génomiques de clones peuvent être préparés à partir des fragments d'ADN produits à l'aide de procédés bien connus dans la technique comprenant sans être limités à celle-ci l'utilisation d'enzymes de restriction. Les fragments qui codent pour TGF- β 2 peuvent être identifiés par criblage de telles bibliothèques avec une sonde de nucléotide qui est sensiblement complémentaire de toute portion de la séquence représentée à la figure 1a. Des clones de longueur totale, c'est-à-dire ceux contenant la région de codage totale pour le précurseur de TGF- β 2 peuvent être choisis en vue de l'expression.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence de codage de la figure 1a peut être synthétisée en entier ou en partie, à l'aide de procédés chimiques bien connus dans la technique. Voir par exemple, Caruthers et al., 1980, Nuc. Acids Res.

Symp. Ser. 7:215-223 ; Crea et Horn, 1980, Nuc Acids.
Res. 9(10):2331 ; Matteucci et Carruthers, 1980,
Tetrahedron Letters 21:719 et Chow et Kempe, 1981, Nuc.
Acids. Res. 9(12):2807-2917. Ou bien encore, la protéine
5 pourrait être produite à l'aide de procédés chimiques
pour synthétiser la séquence d'acides aminés représentée
à la figure 1a en entier ou en partie. Par exemple, des
peptides peuvent être synthétisés par des procédés en
phase solide sur un instrument Beckman 990, et clivés à
10 partir de la résine comme décrit précédemment (Gentry,
L.E., et al, 1983, J. Biol. Chem. 258:11219-11228 ;
Gentry, L.E. et Lawton, A., 1986, Virology 152:421-431).
La purification peut être réalisée par chromatographie
liquide préparative à haute performance. La composition
15 des peptides a été confirmée par analyse des acides
aminés.

Dans un mode de réalisation spécifique, décrit
dans les exemples ci-inclus, la séquence de codage de
TGF- β 2 a été obtenue par clonage par ADNc de séquences de
20 codage de précurseur de TGF- β 2 humain dérivées d'ARN
polyadénylé isolé à partir d'une lignée cellulaire
d'adénocarcinome de la prostate humain traitée par
tamoxifen, PC3, dont il a été montré précédemment qu'elle
produit TGF- β 2. La région de codage entière d'un clone
25 d'ADNc a été séquencée et comparée à la séquence publiée
de TGF- β 1 humain (voir figure 2).

L'analyse de séquences d'ADN des clones d'ADNc
de TGF- β 2 indiquent que TGF- β 2 de même que TGF- β 1 est
synthétisé sous forme d'une protéine précurseur de grande
30 taille, dont l'extrémité carboxy est clivée pour produire
le monomère mature de TGF- β 2 de 112 acides aminés. Il a
été montré que TGF- β 2 a un poids moléculaire de 24 000
composé de deux sous-unités de 13 000 daltons liés par
ponts disulfure (Ikeda et al., 1987, Biochemistry
35 26:2406-2410 ; Cheifetz et al., 1987, Cell 48:409-415).

Ainsi, la production de TGF- β 2 nécessite un clivage protéolytique approprié de même que la formation de ponts disulfure intra- et intermoléculaires. Une séquence leader hydrophobe à l'extrémité amine (résidu 3-19) est présente dans le précurseur et peut être responsable du fait de diriger la protéine hors de la cellule. Le TGF- β 2 mature peut encore être associé à la partie restante du précurseur au cours de ce processus.

TGF- β 2 présente 71 % d'homologie avec TGF- β 1 dans toute la partie mature du précurseur, ce qui implique une similarité fonctionnelle qui est soutenue par les preuves expérimentales (Seyedin et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:1946-1949 ; Cheifetz et al., 1987, Cell 48:409-415). La partie amine de la région précurseur de TGF- β 1 provenant de sources humaines, de rongeurs ou de sources simiennes (Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705; Derynck et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:4377-4379; Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) est hautement conservée et suggère que cette partie de la molécule peut avoir une fonction biologique importante. Par contraste, il n'y a pas plus de 31 % d'homologie entre les régions précurseur N-terminales de TGF- β 1 et TGF- β 2. Après clivage du peptide signal supposé, le précurseur de TGF- β 2 contiendrait également davantage d'acides aminés que le précurseur de TGF- β 1. Les différences structurales primaires à l'intérieur de la région de l'extrémité amine des protéines précurseur de TGF- β 1/TGF- β 2 peuvent refléter des différences fonctionnelles. Cependant, des régions homologues de façon significative à l'intérieur des précurseurs sont trouvées dans des blocs isolés suggérant la conservation de domaines fonctionnels importants même à l'intérieur de la région précurseur N-terminales.

L'analyse par Northern blot a révélé deux classes de dimensions importantes de l'ARNm spécifique de TGF- β 2 de 4,1 et 6,5 kb dans les cellules de BSC-40. Les cellules de PC-3 traitées au tamoxifen contiennent trois séquences transcrites de TGF- β 2 de 4,1 kb, 5,1 kb et 6,5 kb. Ces messages de dimensions différentes pourraient être le résultat d'épissage d'ARN différentiel, de la polyadénylation, ou des deux comme cela a été décrit pour d'autres gènes (Helfman et al., 1986, Mol Cell. Biol. 6:3582-3595; Sayre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2941-2945). Une analyse préliminaire d'un autre clone d'ADNc de TGF- β 2 montre qu'il contient une région non traduite en 3' plus grande d'environ 1 kb que celle de pPC-21 et de pPC-14 et qu'il contient un site de polyadénylation différent suggérant qu'une autre polyadénylation est un facteur responsable de la production d'ARNm de TGF- β 2 multiples observés sur des Northern blots.

Les cellules de BSC-40 contiennent des niveaux comparables de séquences transcrites spécifiques de TGF- β 1 et TGF- β 2 : les cellules de PC-3 traitées au tamoxifen contiennent davantage d'ARNm de TGF- β 1 que TGF- β 2 (figure 3B). Ce dernier résultat est inattendu puisque ces cellules produisent davantage de protéine de TGF- β 2 que TGF- β 1 (Ikeda et al, 1987, Biochemistry 26: 2406- 2410) et suggère un niveau de post-transcription de régulation concernant la synthèse de ce modulateur de croissance. Les expériences destinées à comprendre les mécanismes de commande de transcription et de traduction qui conduisent à la production de TGF- β 1 et de TGF- β 2 sont en cours. La production de quantités adéquates de TGF- β 2 par des techniques d'ADN recombinant, comme cela a été fait pour TGF- β 1, devrait encore aider à concevoir des expériences pour explorer les différents effets de cette protéine.

Dans un autre mode de réalisation, la séquence de codage de TGF- β 2 a été obtenue par clonage par ADNc de séquences de codage de précurseur de TGF- β 2 simien dérivées d'ARN polyadénylé isolé à partir d'une lignée cellulaire de callitriche africain, BSC-40. La région codante totale d'un clone d'ADNc a été séquencée. Les précurseurs de TGF- β 2 humain et simien semblent avoir des séquences d'acides aminés identiques, et leurs séquences de nucléotides sont à peu près identiques.

Afin d'exprimer une forme mature biologiquement active de TGF- β 2 on devrait choisir un système vecteur d'expression/hôte pourvoyant non seulement à des niveaux élevés de transcription et de traduction mais aussi à l'élaboration correcte du gène produit. Ceci est particulièrement important lorsqu'on utilise la séquence codante entière d'un précurseur de TGF- β 2 dans les vecteurs d'expression car la forme mature de TGF- β 2 semble être dérivée du produit de précurseur par l'intermédiaire de phénomènes de transformation cellulaire. En outre, un système expression/cellule hôte qui pourvoit à la sécrétion du produit peut être choisi.

En particulier, il apparaît que le TGF- β 2 mature, un homodimère lié par pont disulfure de 112 acides aminés par sous-unité peut être formé par transformation cellulaire mettant en jeu un clivage protéolytique entre les acides aminés Arg-Ala du précurseur (résidus numéros 330 et 331 à la figure 1a). En outre, le précurseur de TGF- β 2 contient trois sites potentiels de N-glycosylation non trouvés dans la forme mature. La glycosylation appropriée du précurseur peut être importante pour la synthèse cellulaire et la libération ou la sécrétion de la molécule mature. En outre, la forme mature de TGF- β 2 comprend un dimère à liaisons disulfure mettant en jeu 9 résidus de cystéine par sous-unité. Certains de ceux-ci sont impliqués dans

les ponts disulfure intercaténares et d'autres dans les ponts disulfure intracaténares qui modifient la structure et la configuration tertiaires de la molécule mature et donc son activité biologique. Ainsi, la
5 capacité d'une cellule hôte utilisée dans le système d'expression d'exprimer et de transformer correctement le produit du gène de TGF- β 2 est importante pour la production d'un TGF- β 2 mature biologiquement actif.

Une variété de systèmes hôte animal/vecteurs
10 d'expression (c'est-à-dire des vecteurs qui contiennent les éléments nécessaires pour diriger la réplication, la transcription et la traduction de la séquence de codage de TGF- β 2 dans une cellule hôte appropriée) peuvent être utilisés aussi bien par l'homme du métier. Ils
15 comprennent mais sans être limités à ceux-ci, les systèmes vecteurs d'expression de virus/cellules hôtes de mammifères (par exemple, cytomégalovirus, virus de vaccine, adénovirus, et analogues) ; les systèmes vecteurs d'expression de virus d'insectes/cellules
20 d'insectes (par exemple, baculovirus) ; ou des systèmes d'expression de promoteurs non viraux dérivés des génomes de cellules de mammifères (par exemple le promoteur de la métallothionine de souris).

Les éléments d'expression de ces vecteurs
25 varient en ce qui concerne leur force et leurs spécificités. Selon le système hôte/vecteur utilisé, l'un quelconque parmi un certain nombre d'éléments de transcription et de traduction appropriés peut être utilisé. Par exemple, lors du clonage dans des systèmes
30 cellulaires de mammifères, des promoteurs isolés à partir du génome de cellules de mammifères, (par exemple le promoteur de métallothionine de souris) ou à partir de virus qui se développent dans ces cellules, (par exemple le promoteur 7,5K du virus de la vaccine) peuvent être
35 utilisés. Des promoteurs produits par des techniques

d'ADN récombinant ou par des techniques synthétiques peuvent également être utilisés pour pourvoir à la transcription des séquences insérées.

Des signaux d'initiation spécifiques sont également nécessaires pour une traduction suffisante des séquences insérées de codage des protéines. Ces signaux comprennent le codon ATG d'initiation et les séquences adjacentes. Dans les cas où le gène de TGF- β 2 entier y compris son propre codon d'initiation et les séquences adjacentes est inséré dans les vecteurs d'expression appropriés, des signaux de commande de traduction supplémentaires peuvent ne pas être nécessaires. Cependant, dans les cas où seule une partie de la séquence codante est insérée, des signaux de commande de traduction exogènes, comprenant le codon d'initiation ATG doivent être fournis. En outre, le codon d'initiation doit être en phase avec le cadre de lecture des séquences de codage de TGF- β 2 pour assurer la traduction de la séquence d'insertion entière. Ces signaux de commande de traductions exogènes et les codons d'initiation peuvent être d'origine variée, naturelle ou synthétique. L'efficacité de l'expression peut être améliorée par inclusion de séquences d'atténuation de transcription, d'éléments d'amélioration, etc.

L'un quelconque des procédés décrits précédemment pour l'insertion de fragments d'ADN dans un vecteur peut être utilisé pour construire des vecteurs d'expression contenant le gène de TGF- β et les signaux de commande de transcription/traduction appropriés. Ces procédés peuvent comprendre des techniques d'ADN recombinant in vitro, des techniques synthétiques et des recombinaisons in vivo (recombinaison génétique).

Dans les cas où un adénovirus est utilisé comme vecteur d'expression, la séquence de codage de TGF- β 2 peut être liée à un complexe de commande de

transcription/traduction d'adénovirus, par exemple le dernier promoteur et la séquence leader tripartite. Ce gène chimérique peut ensuite être inséré dans le génome de l'adénovirus par recombinaison in vitro ou in vivo.

5 L'insertion dans une région non essentielle du génome viral (par exemple, la région E1 ou E3) va entraîner la formation d'un virus recombinant qui est viable et capable d'exprimer TGF- β 2 dans des hôtes affectés. De façon similaire, le promoteur 7,5K de la vaccine peut

10 être utilisé.

Un autre système d'expression qui pourrait être utilisé pour exprimer TGF- β 2 est un système d'insecte. Dans un tel système, le virus de la polyhedrose nucléaire de Autographa californica (AcNPV) est utilisé en tant que

15 vecteur pour exprimer des gènes étrangers. Le virus se développe dans les cellules de Spodoptera frugiperda. La séquence de codage de TGF- β 2 peut être clonée dans des régions non essentielles (par exemple le gène de polyhedrine) du virus et placée sous le contrôle d'un

20 promoteur de AcNPV (par exemple le promoteur de polyhedrine). L'insertion réussie de la séquence de codage de TGF- β 2 va entraîner l'inactivation du gène de polyhedrine et la production de virus recombinant non occlus (c'est-à-dire un virus dépourvu du revêtement protéique pour lequel code le gène de polyhedrine). Ces

25 virus recombinants sont ensuite utilisés pour infecter des cellules de Spodoptera frugiperda dans lesquelles le gène inséré est exprimé.

En outre, on peut choisir une souche de

30 cellules hôtes qui module l'expression des séquences insérées, ou qui modifie et transforme le produit de gène de la façon spécifique souhaitée. L'expression de certains promoteurs peut être augmentée en présence de certains inducteurs, (par exemple les ions zinc et

35 cadmium pour les promoteurs de métallothionine). Ainsi,

l'expression du TGF- β 2 obtenu par génie génétique peut être contrôlée. Ceci est important si le produit de protéine du gène étranger cloné est léthal vis-à-vis des cellules hôtes. En outre, les modifications (par exemple glycosylation) et les transformations (par exemple clivage) de produits de protéines sont importantes pour la fonction de la protéine. Différentes cellules hôtes ont des mécanismes caractéristiques et spécifiques pour la transformation et la modification post-traduction des protéines. Des lignées cellulaires ou des systèmes hôtes appropriés peuvent être choisis pour assurer la modification et la transformation correctes de la protéine étrangère exprimée.

Les cellules hôtes qui contiennent la séquence de codage de TGF- β 2 recombinant et qui expriment le produit mature biologiquement actif peuvent être identifiées par au moins quatre approches générales : (a) hybridation ADN-ADN ; (b) présence ou absence de fonctions de gène "marqueur" ; (c) estimation du niveau de transcription tel que mesuré par l'expression des séquences de transcription d'ARNm de TGF- β 2 dans la cellule hôte et (d) détection du produit de gène mature tel que mesuré par immunoessai et, finalement, par son activité biologique.

Dans la première approche, la présence de la séquence de codage de TGF- β 2 insérée dans le vecteur d'expression peut être détectée par hybridation ADN-ADN à l'aide de sondes comprenant les séquences nucléotidiques qui sont homologues de la séquence de codage de TGF- β 2 sensiblement comme montré à la figure 1a, ou de parties ou de dérivés de celle-ci.

Dans la seconde approche, le système vecteur d'expression recombinant/hôte peut être identifié et choisi sur la base de la présence ou de l'absence de certaines fonctions de gène "marqueur" (par exemple,

activité de thymidine kinase, résistance aux
antibiotiques, résistance au méthotrexate, phénotype de
transformation, formation d'un corps d'occlusion dans le
baculovirus, etc.). Par exemple, si la séquence de codage
de TGF- β 2 est insérée dans une séquence de gène marqueur
5 du vecteur, les recombinants contenant la séquence de
codage de TGF- β 2 peuvent être identifiés par l'absence de
la fonction de gène marqueur. Ou bien encore, un gène
marqueur peut être placé en tandem avec la séquence de
10 TGF- β 2 sous le contrôle du même promoteur ou d'un
promoteur différent utilisé pour commander l'expression
de la séquence de codage de TGF- β 2. L'expression du
marqueur en réponse à l'induction ou à la sélection
indique l'expression de la séquence de codage de TGF- β 2.

15 Dans la troisième approche, l'activité de
transcription pour la région de codage de TGF- β 2 peut
être évaluée par des essais d'hybridation. Par exemple,
l'ARN polyadénylé peut être isolé et analysé par Northern
blot à l'aide d'une sonde homologue de la séquence de
20 codage de TGF- β 2 ou de parties particulières de celle-ci.
Ou bien encore, les acides nucléiques totaux de la
cellule hôte peuvent être extraits et testés en ce qui
concerne l'hybridation avec de telles sondes.

Dans la quatrième approche, l'expression de la
25 protéine mature produite peut être estimée de façon
immunologique, par exemple par des Western blots, des
immunoessais tels que la radioimmunoprécipitation, des
immunoessais liés à des enzymes et analogues. Cependant,
le test ultime quant au succès du système d'expression
30 inclue la détection du produit de gène de TGF- β 2
biologiquement actif. Lorsque la cellule hôte secrète le
produit de gène, le milieu dépourvu de cellules obtenu à
partir de la cellule hôte transfectante cultivée peut
être testé pour l'activité de TGF- β 2. Lorsque le produit
35 de gène n'est pas secrété, des lysats cellulaires peuvent

être testés pour une telle activité. Dans chacun des cas, les essais biologiques tels que l'essai d'inhibition de croissance décrit ici ou la stimulation de la croissance indépendante de l'ancrage dans des cellules cibles
5 (Twardzik et Sherwin, 1985, J. Cell. Biochem. 28:289-297; Delarco et Todaro, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:4001-4005) ou analogues peuvent être utilisées.

Un clone produisant des niveaux élevés de TGF- β 2 mature biologiquement actif étant identifié, le
10 clone peut être étendu et le TGF- β 2 peut être purifié à l'aide de procédés bien connus dans la technique. De tels procédés comprennent la purification par immunoaffinité, les procédés chromatographiques comprenant la chromatographie liquide à haute performance, et
15 analogues.

Les exemples suivants décrivent le clonage par ADNc de séquences de codage de précurseur de TGF- β 2 provenant de la lignée cellulaire de l'adénocarcinome de la prostate humain, PC-3, de laquelle le TGF- β 2 a été
20 isolé précédemment.

Les modes opératoires suivants, illustrant les matériaux et méthodes, ont été utilisés pour cloner des ADNc codants pour le précurseur de TGF- β 2 humain.

La lignée cellulaire de l'adénocarcinome de prostate humain, PC-3, a été cultivée dans un milieu complété au tamoxifen comme décrit (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26:2406-2410). Des cellules de MCF-7 ont été cultivées dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco contenant 10 % de sérum de fœtus de veau et 6 unités/ml
25 d'insuline. Toutes les autres lignées cellulaires ont été cultivées dans le même milieu sans insuline. L'ARN
30 polyadénylé a été isolé par chromatographie sur oligo[dT]-cellulose comme décrit (Purchio et Fareed, 1979, J. Virol. 29:763-769).

Un ADNc double brin a été synthétisé à partir d'ARN polyadénylé isolé à partir de cellules de PC-3 traitées par le tamoxifen pendant 24 heures comme décrit (Maniatis et al., 1982, dans Molecular Cloning : A
 5 Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). Des fractions d'ADNc supérieures à 1000 paires de bases ont été clonées dans lambda gt10 comme décrit (Webb et al., 1987, DNA 6:71-79). La
 10 bibliothèque a été tout d'abord criblée en double avec une sonde 24 fois dégénérée marquée au [³²P] complémentaire d'acides aminés WKWIHEP codant pour l'ADN (sonde 1) qui sont conservés entre TGF-β1 et TGF-β2 :

[5'-GGTTCGTGTATCCATTCCA-3']

15 C A G C
 A

Les clones positifs ont ensuite été criblés avec une seconde sonde dégénérée 128 fois complémentaire d'acides aminés CFRNVQD codant pour l'ADN (sonde 2); cinq de ces sept acides aminés sont spécifiques de TGF-β2 :

20 [5'TCTTGAACGTTTCTGAAGCA-3']

C C A C A A
 G
 T

L'hybridation a été réalisée à 42°C dans 6X de SSC, dans
 25 5X de solution de Denhart, dans le pyrophosphate 0,15 mM, dans 100 microgrammes/ml d'ADN de thymus de veau dénaturé, dans 100 microgrammes/ml d'ARNt de levure et 1mM d'EDTA (Maniatis et al., 1982, dans Molecular
 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). Les filtres ont été lavés
 30 à 42°C dans 2XSSC, NaDodSO₄ à 0,1 %, quatre fois pendant

30 minutes. On a isolé plusieurs clones d'ADNc qui s'hybridaient aux deux sondes et qui ont été sous-clonés dans pEMBL (Dante et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:1645-1654). Un clone (pPC-21) contenant une séquence d'insertion de 2,6kb a été séquencé sur les deux brins par la réaction de terminaison au didésoxy nucléotide (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467) à l'aide de différents fragments de restriction et de délétion d'exonucléase III combinés à un amorçage d'oligonucléotide spécifique (Henikoff, 1984, Gene 28:351-359). Un autre clone (pPC-14) contenant une séquence d'insertion de 2,2kb a été partiellement séquencé. L'analyse par matrice de points a été réalisée sur un PCAT IBM à l'aide du logiciel Gene Pro de Riverside Scientific Enterprises (Seattle, WA).

L'ARN polyadénylé a été fractionné sur un gel agaroseformaldéhyde à 1 % (Lehrach et al., 1977, Biochemistry 16:4743-4751), transféré sur une membrane de nylon (Hybond, Amersham), et hybridé avec une sonde marquée au [³²P]. L'hybridation a été réalisée à 42°C dans du formamide à 50 % contenant 0,9 M de NaCl, 50 mM de phosphate de sodium (pH 7), 5mM d'EDTA, 0,1% de NaDodSO₄, 4X de solution de Denhardt, 0,4 mg/ml d'ARNt de levure, et 0,25mg/ml d'ADN de thymus de veau dénaturé. Les filtres ont été lavés à 65°C dans 0,25X de SSC, 0,1 % de NaDodSO₄, séchés et exposés à un film de rayons X Cronex-4 (DuPont) à l'aide d'écrans d'intensification Lightening Plus (DuPont).

Une bibliothèque d'ADNc a été construite à l'aide d'ARN polyadénylé isolé à partir de cellules de PC-3 traitées au tamoxifen. Des observations précédentes indiquaient que le traitement au tamoxifen provoquait un accroissement de deux à cinq fois la sécrétion de TGF-β2 (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26-2406-2410). La bibliothèque a été criblée avec les sondes 1 et 2 comme

décrit ci-dessus. On a obtenu cinq clones qui se sont hybridés aux deux sondes. Un clone, pPC-21, contenant une séquence d'insertion de 2,6kb, a été choisi pour le séquençage. Un autre clone, pPC-14 contenant une séquence
5 d'insertion de 2,2kb, a été partiellement séquencé. L'ADN et les séquences d'acides aminés déduites sont montrés à la figure 1.

pPC-21 contient un seul cadre de lecture ouvert codant pour un polypeptide déduit de 442 acides aminés ; les 112 acides aminés de l'extrémité carboxy
10 comprennent le monomère de TGF- β 2 mature (encadré à la figure 1a). La première méthionine codée par le cadre de lecture ouvert est immédiatement suivie par une étendue d'acides aminés hydrophobes et non chargés (surmontée
15 d'un trait à la figure 1a) caractéristique d'un peptide signal. Ni la séquence nucléotidique codant pour cette méthionine ni celles codant pour les deux méthionines suivantes présentes dans le cadre de lecture ouvert ne sont homologues de la séquence de consensus pour la
20 séquence de méthionine d'initiation (kozak, 1986, Cell 44:283-292). Du fait que la traduction débute habituellement avec la première méthionine dans un cadre de lecture ouvert et du fait que des régions homologues de TGF- β 1, comme discuté ci-dessous, surviennent en amont
25 de la seconde méthionine, on a tenté d'attribuer à la première méthionine le site du début de la traduction. Il apparaît alors que TGF- β 2, de même que TGF- β 1, est exprimé en tant que partie d'un précurseur sécrété de bien plus grande taille. Le clone de pPC-21 contient 467
30 bp en amont de la méthionine supposée d'amorçage et une région non traduite en 3' d'approximativement 800 bp incluant une terminaison poly [A], quinze bases en amont de laquelle est située une séquence signal de polyadénylation (Proudfoot et Brownlee, 1976, Nature
35 263:211-214).

L'homologie de séquences de nucléotides à l'intérieur des régions codantes du clone d'ADNc pPC-21 de TGF- β 1 et TGF- β 2 a été déterminée comme étant de 53 %. Les régions codant pour les protéines matures ont 57 % d'homologie tandis que les régions précurseurs en amont ont 48 % d'homologie. Après alignement optimal des deux séquences, plusieurs insertions de nucléotides ont été notées dans la région précurseur de TGF- β 2, l'une d'elles s'étendant sur 75 nucléotides. On ignore si ces insertions sont dues à la présence d'exons supplémentaires dans TGF- β 2. Aucune homologie significative n'a été détectée entre les séquences d'ADN dans les régions non codantes des deux clones. En fait, tandis que TGF- β 1 comportait des régions étendues non codantes riches en G-C, TGF- β 2 comportait des régions extensives non codantes riches en A-T. Les deux clones d'ADNc contiennent des motifs structuraux répétitifs dans la région non codante en 3', les motifs répétitifs dans TGF- β 1 consistant en CCCC (purine) (Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) et dans TGF- β 2 en ATG ou A(pyrimidine) (purine).

La localisation des sites de restriction de nombreux clones a révélé qu'un clone, pPC-14, manquait d'un site de restriction KpnI situé dans la partie amine de la séquence de codage de TGF- β 2. Les sites de restriction de pPC-14 et de pPC-21 sont montrés à la figure 1d. pPC-14 a été séquencé sur une étendue d'environ 100 nucléotides correspondant à cette région de la molécule par amorçage spécifique avec un oligonucléotide de 20-mer complémentaire des nucléotides 277 à 296 dans la figure 1a. Les résultats montrent que le clone pPC-14 contient une délétion de 87 nucléotides (positions de nucléotides 346 à 432 dans la figure 1a ; voir aussi figure 1e) qui explique le site KpnI manquant et qui est remplacé par la séquence AAT, le codon pour

l'asparagine. Les résultats suggèrent que le clone pPC-14 code pour un précurseur de TGF- β 2 plus court de 414 acides aminés différent de la séquence pour laquelle code pPC-21 seulement en ce que les résidus d'acides aminés 116 à 144 sont supprimés et remplacés par un seul résidu d'asparagine.

Bien que la région codante entière de pPC-14 n'ait pas été déterminée, elle est probablement en accord parfait avec la séquence de codage de pPC-21 puisque, à l'exception du site KpnI, les sites de restriction des deux clones se recouvrent parfaitement (figure 1d). En outre, un clone simien codant pour un précurseur de TGF- β à 414 acides aminés contenant la même délétion de 29 acides aminés et le même remplacement a été identifié comme décrit dans la section 7 en exemple ci-dessous. Ce clone simien a une séquence codante qui est à peu près identique à celle du clone pPC-21 humain dans les régions 5' et 3' par rapport à la délétion.

La figure 2A montre la séquence protéique déduite de TGF- β 1 humain (Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705) comparée à celle de TGF- β 2-442 humain. On a déterminé que TGF- β 2 est homologue à 71 % de TGF- β 1 humain dans toute la partie mature de la molécule comme décrit précédemment (Marquardt et al. 1987, J. Biol. Chem., sous presse). La partie amine du précurseur en amont de la molécule mature montre une homologie de 31 % entre TGF- β 1 et TGF- β 2-442. La comparaison d'homologie par matrice de points montrée à la figure 2B révèle qu'une homologie significative existe dans plusieurs zones spécifiques des protéines. La comparaison des séquences d'acides aminés N-terminales dans la région supposée de peptide signal ne révèle pas d'homologie significative.

Dans TGF- β 2, le site de clivage de séquence signal est prédit comme étant situé après l'acide aminé 20 (sérine) et après l'acide aminé 29 (glycine) dans TGF- β 1 (Von Heijne, 1983, Eur. J Biochem. 133:17-21). Ce site de clivage précède directement le premier bloc d'homologie entre TGF- β 1 et TGF- β 2 qui s'étend sur 34 acides aminés en aval. Après élimination des séquences de signal, les précurseurs de TGF- β 1 et TGF- β 2 partageraient des terminaisons N identiques sur les quatre premiers acides aminés, y compris la cystéine en position 4. Quatorze acides aminés en aval de cette extrémité N supposée, 19 acides aminés parmi les 21 acides aminés suivants sont conservés entre TGF- β 1 et TGF- β 2, un bloc d'homologie plus important que tous ceux déjà vus même dans la région C-terminale contenant la protéine de TGF- β mature. Plusieurs autres blocs de forte homologie existent à l'intérieur de la région en amont de la protéine mature comme représenté aux figures 2A et 2B. Ces domaines sont séparés par de longues étendues d'acides aminés non homologues.

Le précurseur de TGF- β 2 comporte trois sites potentiels de N-glycosylation (situés au niveau des résidus 72, 168 et 269 à la figure 1a). Seul le premier site est conservé dans TGF- β 1, et est situé à l'intérieur d'un bloc plus important de résidus conservés, suggérant que ce site potentiel de glycosylation a des caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles importantes.

Après élimination de la séquence signal, le précurseur de TGF- β 2 contiendrait 31 ou 59 acides aminés de plus que sa contrepartie de TGF- β 1. Un résidu de cystéine supplémentaire dans TGF- β 2 est situé juste en amont d'une région de grande taille d'acides aminés non homologues qui précède la séquence mature. Comme avec TGF- β 1, le site de clivage de la protéine de TGF- β 2

mature se situe juste après une région de 4-5 acides aminés basiques comme montré à la figure 2A. La région mature contient neuf cystéines. La conservation de 7 des 9 cystéines est caractéristique des différents membres de la famille de TGF- β . Les analyses d'hydropathie de TGF- β 1 et de TGF- β 2 révèlent des motifs semblables dans le précurseur et dans les régions matures, les deux protéines étant généralement de nature hydrophile (données non représentées).

La figure 3A montre une analyse par Northern blot à l'aide de pPC-21 pour tester l'ARN polyadénylé provenant de BSC-40 (une lignée cellulaire du rein du callitriche africain) et de cellules de pPC-3 traitées au tamoxifen. Les cellules de PC-3 contiennent trois espèces majeures d'ARNm spécifiques de TGF- β 2 ayant une taille de 4,1, 5,1 et 6,5 kb (figure 3A, bande 2) ; les cellules de BSC-40 contiennent de façon prédominante les séquences de transcription de 4,1 et 6,5 kb et des quantités moindres de l'ARN de 5,1 kb (figure 3A, bande 1). Il est à noter que la sonde de pPC-21 ne détecte pas l'espèce d'ARNm spécifique de TGF- β 1 de 2,5 kb présente dans cette lignée cellulaire dans les conditions d'hybridation utilisées ici. Ces résultats et des observations antérieures (Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) suggèrent que les cellules de BSC-40 contiennent les ARNm spécifiques de TGF- β 1 et de TGF- β 2. Afin de démontrer ceci plus clairement, des Northern blots ont été hybridés à un mélange contenant des quantités égales de sondes de TGF- β 1 et de TGF- β 2 radio-marquées à la même activité spécifique. La bande 1 de la figure 3B montre que les cellules de BSC-40 contiennent l'ARNm spécifique de TGF- β 1 de 2,5 kb de même que les espèces d'ARNm de TGF- β 2 de 4,1 et 6,5 kb : la bande 2 de la figure 3B montre que les cellules de PC-3 traitées au tamoxifen contiennent aussi l'ARNm spécifique

de TGF- β 1 de 2,5 kb. La figure 3B démontre aussi que les cellules de PC-3 traitées au tamoxifen contiennent davantage de message spécifique de TGF- β 1 que de message spécifique de TGF- β 2.

5 L'identification des clones d'ADNc spécifiques de TGF- β 2 nous a permis de cribler pour l'ARNm de TGF- β 2 dans différentes lignées cellulaires. Le Northern blot
montré à la figure 4, montre que des séquences de
transcription spécifiques de TGF- β 2 pourraient être
10 détectées dans HBL100 (une lignée cellulaire épithéliale normale dérivée du lait humain, obtenue du Dr. Greg Schultz), MCF-7 (une lignée cellulaire de carcinome mammaire humain), SK-MEL 28 (une lignée cellulaire de mélanome) et de cellules de KB (une lignée cellulaire de
15 carcinome nasopharyngien) contenant de très faibles niveaux d'ARNm de TGF- β 2.

Les exemples suivants décrivent le clonage par ADNc de séquences de codage de TGF- β 2 provenant de la
lignée cellulaire du rein du callitriche africain,
20 BSC-40, qui s'est révélée contenir des ARNm spécifiques de TGF- β 2 (description ci-dessus). Les résultats indiquent que le TGF- β 2 simien, de même que le TGF- β 2 humain, est synthétisé comme l'un d'au moins deux précurseurs plus longs desquels est dérivée la molécule
25 de TGF- β 2 mature par clivage protéolytique.

Les modes opératoires suivants ont été utilisés pour cloner les ADNc codant pour le précurseur de TGF- β 2 simien.

30 Des cellules de BSC-40 ont été cultivées dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco contenant 10 % de sérum de fœtus de veau. L'ARN polyadénylé a été isolé par chromatographie sur oligo[dT]-cellulose comme décrit (Purchio et Fareed, 1979, J Virol. 29:763-769).

Un ADNc double brin a été synthétisé à partir d'ARN polyadénylé de BSC-40 comme décrit (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 371-372) et, après traitement avec EcoRI méthylase, a été
5 lié à des liants d'oligonucléotide contenant un site de reconnaissance d'enzyme de restriction de EcoRI (liants de EcoRI). L'ADNc a été soumis a une digestion avec EcoRI et a été fractionné par chromatographie sur Sephacryl
10 S-1000. Les fractions d'ADNc supérieures à 750 paires de bases ont été rassemblées et liées dans lambda gt10 qui avait été coupé avec EcoRI (Davis et al., 1980, A Manual for Genetic Engineering : Advanced Bacterial Genetics ; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY),
15 emballées (Grosveld et al., 1981, Gene 13:227-237) et plaquées sur E. coli C₆₀₀ rK⁻mK⁺hfl. La bibliothèque a été criblée par hybridation sur plaque (Benton et al., 1977, Science 196:180-182) à des sondes de pPC-21 et de pPC-14 marquées au [³²P]. Le clone pBSC-40-16, qui a
20 hybridé la sonde pPC-21, et le clone pBSC-40-1, qui a hybridé la sonde pPC-14, ont été isolés et sous-clonés dans pEMBL. La séquence de codage de TGF-β2 de pBSC-40-1 a été déterminée par séquençage des deux brins à l'aide de la réaction de terminaison au didésoxy nucléotide
25 (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467). pBSC-40-16 a été partiellement séquencé.

Deux clones ont été obtenus à partir d'une bibliothèque d'ADNc de BSC-40 qui se sont hybridés tour à tour avec des sondes construites à partir des séquences
30 de codage de précurseur de TGF-β2-442 et de TGF-β2-414 humain.

Le clone pBSC-40-16 qui s'est hybridé à la sonde de TGF-β2-442, a été séquencé sur une étendue de 150 nucléotides (nucléotides 300 à 450 à la figure 1a)
35 supposée contenir la séquence codante pour le segment de

29 acides aminés depuis la position 346 jusqu'à la position 432 à la figure 1a. Les résultats montrent que, dans cette région, pBSC-40-16 code pour une séquence d'acides aminés qui est identique à la séquence correspondante du clone d'ADNc de TGF- β 2-442 humain, pPC-21, et suggèrent que pBSC-40-16 code pour un précurseur de TGF- β 2 de 442 acides aminés.

Le clone pBSC-40-1, qui s'est hybridé à la sonde de TGF- β 2-414, a été séquencé sur toute la région codante. Les résultats montrent que ce clone code pour un précurseur de TGF- β 2 de 414 acides aminés qui est identique au précurseur de TGF- β 2-442 humain sauf que les résidus d'acides aminés 116 à 144 de TGF- β 2-442 humain sont supprimés et remplacés par un seul résidu d'asparagine. Au niveau du nucléotide, pBSC-40-1 diffère de TGF- β 2-442 humain dans la région de délétion : les nucléotides 346 à 432 à la figure 1a sont supprimés et remplacés par le codon pour l'asparagine, AAT. A l'exception de 13 changements silencieux de bases, les deux structures sont autrement parfaitement homologues sur le reste de la séquence codante.

Les exemples suivants, décrivent l'expression de TGF- β 2 mature biologiquement actif dans les cellules ovariennes de Hamster chinois (cellules de CHO) transfectées avec un plasmide recombinant contenant la séquence codant pour le TGF- β 2 humain mature lié en aval et par encadrement avec la séquence codant pour le précurseur de TGF- β 1 simien, sous le contrôle régulateur des séquences de promoteur de SV40. La séquence de construction a dirigé la synthèse et la sécrétion de TGF- β 2 mature biologiquement actif à un niveau d'environ 0,5 mg/L.

Des cellules ovariennes de Hamster chinois (CHO) déficientes en dihydrofolate réductase (dhfr) (Urlaub et Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

77:4216) ont été propagées dans un milieu F-12 de Ham (Gibco Laboratories, NY) complété par 10 % de sérum bovin foetal (FBS) et 150 µg/ml de L-proline. De la pénicilline et de la streptomycine ont été incorporées à raison de 100 U/ml et 100 µg/ml, respectivement. Les transfectants de CHO ont été cultivés dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco contenant les mêmes compléments que ceux énumérés ci-dessus. Les cellules de CHO et leurs dérivés ont été séparés de leurs supports par trypsination de façon routinière à un rapport de séparation de 1:5.

Le Méthotrexate (Sigma, MO) a été préparé à une concentration de réserve de 10 mg/ml dans l'eau. NaOH dilué (0,2 M) a été ajouté afin de solubiliser le médicament (pH final de 6). La réserve a été stérilisée par filtration et stockée à - 20°C. Des solutions mères de méthotrexate dans un milieu (100 µM) ont été maintenues à 4°C pendant pas plus d'un mois.

Des enzymes de restrictions, l'ADN ligase T4, la phosphatase intestinale de veau, le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et d'autres réactifs d'ADN ont été achetés auprès de Bethesda Research Laboratories, MD. Des manipulations standards d'ADN ont été réalisées comme décrit dans Maniatis, T., et al., 1982, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Le plasmide pSV2 (B1-TGF-dhfr) qui contient l'ADNc de TGF-B1 et le gène dhfr de souris en tandem de même que des séquences intervenantes de SV40, a été construit comme décrit (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418).

Le plasmide pSV2/B1-B2/dhfr a été construit comme décrit plus loin aux pages 37, 38 et 39 premier paragraphe.

Environ 24 heures après l'ensemencement de 10^6 cellules de CHO déficientes en dhfr dans des bacs de 100mm, les cultures ont été transfectées avec 20 µg de plasmide pSV2-(B1-TGF-dhfr) linéarisé par NdeI sous forme d'un précipité de phosphate de calcium (Wigler, M., et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:1373-1376).
Brièvement, 20 µg d'ADN linéarisé ont été ajoutés à 1 ml de CaCl_2 stérile 250 mM. Une portion de 1 ml de solution 2X HEPES (280 mM de NaCl, 50 mM de HEPES, 1,4 mM de phosphate de sodium, pH 7,1) a ensuite été ajoutée goutte à goutte, et on a laissé reposer le mélange sur la glace pendant 30 minutes. Puis le précipité a été dispersé goutte à goutte sur les cellules contenant 10 ml du milieu F12. Après incubation à 37°C pendant 4 heures, le milieu a été éliminé et remplacé par 10 ml de milieu F12 contenant 25 % de glycérol pendant 90 secondes à la température ambiante. Les cellules ont été rincées une fois avec 20 ml de milieu F12 et ont été mises à incuber dans le milieu F12 non sélectif (20 ml) pendant encore 48 heures. La sélection des transfectants exprimant dhfr a été accomplie en remplaçant le milieu par DMEM complété par 10 % de FBS dialysé (Gibco, N.Y.) et 150 µg/ml de L-proline. Des colonies ont été observées après culture des cellules pendant 10-14 jours dans le milieu de sélection. Dix colonies ont été aspirées au moyen d'une pipette pasteur et étalées.

Des cellules amplifiées à la dihydrofolate réductase (dhfr) ont été dérivées des transfectants primaires essentiellement comme décrit (Gasser, C.S. et Schimke, R.T., 1986, J. Biol. Chem. 261:6938-6946). Après étalement, 10^5 cellules ont été ensemencées dans des bacs de 100 mm et adaptées à des concentrations croissantes de méthotrexate. La plaque contenant des colonies visibles à la concentration la plus élevée en méthotrexate a été trypsinée et adaptée à cette concentration de

méthotrexate pendant au moins deux autres séparations 1:5 de cellules. Des cellules (10^5) ont alors étéensemencées dans des bacs de 100 mm à 5 fois la concentration de méthotrexate. Le bac contenant des colonies visibles a de
5 nouveau été trypsiné et adapté au milieu contenant le méthotrexate. Les cellules ont été figées de nouveau à différents stades d'amplification dans des milieux contenant 40 % de FBS, 10 % de diméthyl sulfoxyde et 50 % de DMEM. Le méthotrexate n'a pas été ajouté au milieu de
10 figeage.

Des cellules épithéliales de poumons de visons, Mv 1 Lu (numéro matricule CCL-64, American Type Culture Collection), qui sont extrêmement sensibles à TGF- β 1, ont été utilisées pour l'essai d'inhibition de croissance.
15 L'essai a été réalisé à l'aide de l'analogue de thymidine 5'-[125 I]-iodo-2' desoxyuridine (125 IdU) pour estimer la synthèse d'ADN. Une unité d'activité a été définie comme étant la quantité nécessaire pour inhiber 50 % d'incorporation de 125 IdU comparée à des cellules de
20 CCL-64 non traitées.

Pour tester les cellules transfectées en ce qui concerne la sécrétion de TGF- β 2 actif, les surnageants dépourvus de sérum ont été recueillis à partir d'une récolte de 24 heures sur les cultures confluentes de
25 cellules et dialysés largement contre de l'acide acétique 0,2 M. L'acide acétique a été éliminé par lyophilisation et l'échantillon a été redissous dans le milieu de culture complet stérile pour les essais.

Un gène précurseur de TGF- β hybride consistant
30 en codage de précurseur de TGF- β 1 simien et en séquences non traduites en 5' jointes par encadrement avec le codage mature de TGF- β 2 humain et avec des séquences non traduites en 3' a été construit comme illustré à la figure 1c.

pPC-21 a d'abord subi une digestion avec EcoRI, rempli avec l'enzyme de Klenow, le fragment 2,3 kb lié à pEMBL ayant subi une digestion avec HincII, et utilisé pour transformer E. coli. Deux clones, pPC-21/HincII⁺ et 5 pPC-21/HincII⁻, ayant des séquences d'insertion dans des orientations opposées, ont été utilisés pour produire des fragments de digestion de ExoIII se recouvrant par digestion avec SstI et BamHI puis par digestion par ExoIII, réparation de Klenow, reliaison de l'ADN, et 10 transformation de E. coli. Deux clones, Exo 5,9 et Exo 25c se sont révélés contenir différentes longueurs des séquences 5' et 3' respectivement, et ont été sous-clonés dans pEMBL pour produire pEMBL 5,9 et pEMBL 25C. pEMBL 5,9 a été mis à digérer avec HindIII, coupé avec 15 des bords francs par l'enzyme de Klenow, mis à digérer avec KpnI, et le fragment 0,6 kb (fragment 1) a été isolé. Exo 25C a été mis à digérer avec EcoRI et KpnI et le fragment 1,1 kb (fragment 2) a été isolé. pGS62 a été mis à digérer avec BamHI, rempli avec l'enzyme de Klenow, 20 mis à digérer avec EcoRI et lié aux fragments 1 et 2 (pGS62 a été dérivé de pGS20 (Mackett et al, 1984, J. Virol. 49:857) par délétion d'un seul site EcoRI). Le mélange a été utilisé pour transformer E. coli et pGS62/CIFB a été isolé.

25 pGS62/CIFB a été mis à digérer avec PstI et EcoRI et le fragment de 1600 bp a été isolé et encore mis à digérer avec XhoII. Le fragment XhoII-EcoRI de 400 bp a été isolé (fragment 3). pSV2-beta-TGF (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418) a été mis à digérer avec 30 ApaI et EcoRI et le grand fragment de 3000 bp a été isolé (fragment 4).

Deux brins complémentaires d'ADN avec les séquences montrées ci-dessous ont été synthétisés, phosphorylés, fusionnés et liés aux fragments "3" et "4" 35 décrits ci-dessus.

'5 CAA CAT CTG CAA AGC TCC CGG CAC CGC CGA GCT TTG
 GAT GCG GCC TAT TGC TTT AGA AAT GTG CAG GAT AAT
 TGC TGC CTA CGT CCA CTT TAC ATT GAT TTC AAG AGG 3'

5 5' GATC CCT CTT GAA ATC AAT GTA AAG TGG ACG TAG GCA
 GCA ATT ATC CTG CAC ATT TCT AAA GCA ATA GGC CGC
 ATC CAA AGC TCG GCG GTG CCG GGA GCT TTG CAG ATG
 TTG GGCC 3'

Le mélange de liaison a été utilisé pour transformer E. coli et pB1/B2 a été isolé.

10 Le plasmide pB1/B2 a été mis à digérer avec EcoRI, rempli avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, coupé avec HindIII et le fragment de 1600bp a été isolé : pSV2,B1/B2 a été construit en insérant ce fragment dans pSV2, neo qui avait été préalablement mis à
 15 digérer avec HindIII et HpaI pour éliminer le neo gène.

pSV2,B1/B2 a été mis à digérer avec PvuI et EcoRI, rempli avec l'enzyme de Klenow, mis à digérer avec NdeI et le fragment NdeI-EcoRI de 2,6 kb (approximativement) a été isolé et lié à pSV2, dhfr qui
 20 avait été mis à digérer avec NdeI et PvuII. Le mélange de liaison a été utilisé pour transformer E. coli et pSV2/B1/B2/dhfr a été isolé.

PSV/B1-B2/dhfr a été utilisé pour transfecter des cellules de CHO déficientes en dhfr et des cellules
 25 amplifiées en dhfr ont été dérivées des transfectants primaires décrits dans matériaux et méthodes ci-dessus.

Les clones positifs ont été identifiés par bioessai (inhibition des cellules épithéliales de poumons de visons (CCL-64) comme décrit (Gentry et al. 1987, Mol.
 30 Cell, Biol. 7:3418). Des protéines recombinantes ont également été détectées en pratiquant un Western blot à l'aide d'anti-sérums anti-peptides préparés contre la

séquence NH₂-YNTINPEASASPC-COOH (Gentry et al., 1987, Mol. Cell, Biol. 7:3418) qui est présente dans le TGF- β 2 mature.

5 Une bande, 1B9, 12,5, s'est révélée secréter 240 ng/ml de TGF- β 2 (figure 5). Cette bande a ensuite été clonée en limitant la dilution dans 96 plaques à cuves. Un clone, 1B9, 12,5, cl 36, a produit approximativement 500 ng/ml (figure 5).

10 L'analyse de la protéine secrétée par ce clone à l'aide d'un Western blot en utilisant un anti-sérum anti-peptide est présentée à la figure 6, montrant la présence du dimère de TGF- β 2 mature de 24 kd de même que la forme précurseur de plus grande taille (approximativement 96 kd).

15 Les micro-organismes suivants ont été déposés auprès de la collection de culture de recherche en agriculture (Agricultural Research Culture Collection), Northern Regional Research Center (NRRL) et les numéros de dépôt suivants leurs ont été attribués.

20	<u>Microorganisme</u>	<u>Plasmide</u>	<u>N° de dépôt</u>
	Escherichia coli HB101	pPC-21	B-18256
	Escherichia coli HB101	pPC-14	B-18333
	Escherichia coli HB101	pBSC-40-1	B-18335
	Escherichia coli HB101	pBSC-40-16	B-18334
25	Ovaire d'hamster chinois	pSV/ β 1- β 2/dhfr	

RE V E N D I C A T I O N S

1. Séquence nucléotidique codant pour le
précurseur du facteur de croissance transformant B2 ,
caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence codante
5 de nucléotides sensiblement telle que représentée à la
figure 1a depuis environ le résidu de nucléotide numéro 1
jusqu'à environ le résidu de nucléotide numéro 1326.

2. Séquence nucléotidique codant pour le
précurseur du facteur de croissance transformant B2,
10 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence codante
de nucléotides sensiblement telle que représentée à la
figure 1a depuis environ le résidu de nucléotide numéro 1
jusqu'à environ le résidu de nucléotide numéro 1326 dans
laquelle la séquence de nucléotide depuis le résidu de
15 nucléotide numéro 346 jusqu'au résidu de nucléotide
numéro 432 est supprimée et remplacée par la séquence de
nucléotide "AAT".

3. Séquence nucléotidique codant pour le
facteur de croissance transformant B2 mature,
20 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence de
nucléotides sensiblement telle que représentée à la
figure 1a depuis environ le résidu de nucléotide numéro
991 jusqu'à environ le résidu de nucléotide numéro 1326.

4. Précurseur du facteur de croissance
25 transformant B2 caractérisé en ce qu'il comprend la
séquence d'acides aminés sensiblement telle que
représentée à la figure 1a depuis environ le résidu
d'acide aminé numéro 1 jusqu'à environ le résidu d'acide
aminé numéro 442.

30 5. Précurseur du facteur de croissance
transformant B2, caractérisé en ce qu'il comprend la
séquence d'acides aminés sensiblement telle que
représentée à la figure 1a depuis environ le résidu
d'acide aminé numéro 1 jusqu'à environ le résidu d'acide

aminé numéro 442 dans laquelle la séquence d'acides aminés depuis le résidu numéro 116 jusqu'au résidu numéro 144 est supprimée et remplacée par un seul résidu d'asparagine.

5 6. Précurseur du facteur de croissance transformant $\beta 2$, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés sensiblement telle que représentée à la figure 1a depuis environ le résidu d'acide aminé numéro 20 jusqu'à environ le résidu d'acide aminé numéro 442.

10 7. Précurseur du facteur de croissance transformant $\beta 2$, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés sensiblement telle que représentée à la figure 1a depuis environ le résidu d'acide aminé numéro 20 jusqu'à environ le résidu d'acide aminé numéro 442 dans laquelle la séquence d'acides aminés depuis le résidu numéro 116 au résidu numéro 144 est supprimée et remplacée par un seul résidu d'asparagine.

20 8. Facteur de croissance transformant $\beta 2$, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés sensiblement telle que représentée à la figure 1a depuis environ le résidu d'acide aminé numéro 331 jusqu'à environ le résidu d'acide aminé numéro 442.

25 9. Séquence nucléotidique codant pour le précurseur du facteur de croissance transformant $\beta 1$ /facteur de croissance transformant $\beta 2$ hybride, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence codante de nucléotides sensiblement telle que représentée à la figure 1b depuis environ le résidu de nucléotide numéro -70 jusqu'à environ le résidu de nucléotide numéro 1755.

30 10. Précurseur du facteur de croissance transformant $\beta 1$ /facteur de croissance transformant $\beta 2$ hybride, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence

d'acides aminés sensiblement telle que représentée à la figure 1b depuis environ le résidu d'acide aminé numéro 1 jusqu'à environ le résidu d'acide aminé numéro 390.

5 11. Précurseur du facteur de croissance transformant $\beta 1$ /facteur de croissance transformant $\beta 2$ hybride caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés sensiblement telle que représentée à la figure 1b depuis environ le résidu d'acide aminé numéro 30 jusqu'à environ le résidu d'acide aminé numéro 390.

10 12. Procédé de production de facteur de croissance transformant $\beta 2$, caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) la culture d'une cellule eucaryote contenant une séquence de nucléotides codant pour le facteur de croissance transformant $\beta 2$ sous le contrôle d'une seconde séquence de nucléotides qui règle l'expression des gènes de sorte qu'un peptide ou une protéine ayant une activité de facteur de croissance transformant $\beta 2$ est produit par la cellule eucaryote ; et

20 (b) l'obtention du facteur de croissance transformant $\beta 2$ à partir de la culture.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour le facteur de croissance transformant $\beta 2$ comprend la séquence de nucléotides sensiblement telle que représentée à la figure 1a depuis le nucléotide numéro 1 jusqu'au nucléotide numéro 1339.

14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour le facteur de croissance transformant $\beta 2$ comprend la séquence de nucléotides sensiblement telle que représentée à la figure 1b depuis le nucléotide numéro -70 jusqu'au nucléotide numéro 1755.

15. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la cellule eucaryote comprend une cellule ovarienne de hamster chinois.

5 16. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la seconde séquence de nucléotides qui contrôle l'expression du gène comprend un promoteur de SV40.

10 17. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la seconde séquence de nucléotides comprend un promoteur et une séquence codant pour un marqueur pouvant être choisi pour lequel la cellule eucaryote est déficiente, de sorte que la cellule eucaryote contenant la séquence codant pour le facteur de croissance transformant $\beta 2$ peut être identifiée.

15 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que le marqueur susceptible d'être choisi comprend la dihydrofolate réductase.

20 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'exposition de la cellule eucaryote au méthotrexate, de sorte que des colonies résistantes qui contiennent des niveaux amplifiés des séquences de codage pour la dihydrofolate réductase et le facteur de croissance transformant $\beta 2$, sont sélectionnées.

25 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que la cellule eucaryote comprend une cellule ovarienne de hamster chinois déficiente en dihydrofolate réductase.

30 21. Procédé de production du facteur de croissance transformant $\beta 2$, caractérisé en ce qu'il comprend

(a) la culture du transfectant 1B9, 12,5, clone 36 tel que déposé auprès de la ATCC ; et

35 (b) l'obtention du facteur de croissance transformant $\beta 2$ à partir de la culture.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le transfectant est mis en culture en présence de méthotrexate.

5 23. Cellule eucaryote, caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléotidique codant pour le facteur de croissance transformant $\beta 2$ sous le contrôle d'une seconde séquence de nucléotides qui règle l'expression du gène de sorte que la cellule eucaryote produit le facteur de croissance transformant $\beta 2$ actif.

10 24. Cellule eucaryote selon la revendication 23, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour le facteur de croissance transformant $\beta 2$ comprend la séquence de nucléotides sensiblement telle que représentée à la figure 1b depuis le nucléotide
15 numéro -70 jusqu'au nucléotide numéro 1755.

25. Cellule eucaryote selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule ovarienne de hamster chinois.

20 26. Cellule eucaryote selon la revendication 23, caractérisé en ce que la seconde séquence de nucléotides qui contrôle l'expression du gène comprend un promoteur de SV40.

25 27. Cellule eucaryote selon la revendication 23, caractérisée en ce que la seconde séquence de nucléotides comprend un promoteur et une séquence codant pour un marqueur pouvant être choisi pour lequel la cellule eucaryote est déficiente, de sorte que la cellule eucaryote contenant la séquence codant pour le facteur de croissance transformant $\beta 2$ simien peut être identifiée.

30 28. Cellule eucaryote selon la revendication 27, caractérisée en ce que le marqueur pouvant être choisi comprend la dihydrofolate réductase.

29. Cellule eucaryote selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule ovarienne de hamster chinois déficiente en dihydrofolate réductase.

5 30. Lignée cellulaire, caractérisée en ce qu'il s'agit de la lignée 1B9, clone 36 de cellules ovariennes de hamster chinois portant pSV/beta 1- beta 2/dhfr telle que déposée auprès de l'ATCC, sous le numéro d'accès CRL 9800.

-467 G C C C C T C C C G T C A C T T C C C A G C T G C C A G C C C G G G A C C T T T T C A T C T T C C C T T T G G C C G G A G G C C C -397
G A C T T C A G A T C C G C C A C T C C G C A C C G A G A C T G A C A C A C T C C C T C T C T T A A A T T A T T T C T A C T T A A T A G C C A C T C G T C T T T T T T T -298
C C C A T C T A T T G C T C C A A G A A T T T T T T T C T T A C T C G C C A A A G T C A G G G T T C C C T C T G C C G T A T T A A T A T T T C C A C T T T T G G A A C T A C T G -199
G C C T T T T C T T T T A A A G G A A T T C A A G C A G G A T A C G T T T T T C T G T T G G C A T T G A C T A G A T T T T G C A A A A G T T C G C A T C A A A A C A C A C A C A A A -100
A A C C A A C A C T C C T T G A T C T A T A C T T T G A G A A T T C T T G A T T T T T T T T A T T C T G A C T T T T A A A A C A C A C T T T T T T T T T T T T T T T T A A A A A -1
MET His Tyr Cys Val Leu Ser Ala Phe Leu Ile Leu His Leu Val Thr Val Ala Leu Ser Leu Ser Thr Cys Ser
ATG CAC TAC TGT GTG CTG AGC GCT TTT CTG ATC CTG CAT CTG GTC ACG CTC GCG CTC AGC CTG TCT ACC TGC AGC 75
35 Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Lys Leu
ACA CTC GAT ATG GAC CAG TTC ATG CCG AAG AGG ATC GAG GCG ATC CCG GGG CAG ATC CTG AGC AAG CTG AAG CTC 150
60 Thr Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Val Pro Pro Glu Val Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg
ACC AGT CCC CCA GAA GAC TAT CCT GAG CCC GAG GAA GTC CCC CCG GAG GTG ATT TCC ATC TAC AAC AGC ACC AGG 225
85 Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser Arg Arg Ala Ala Cys Glu Arg Ser Asp Asp Glu Glu Tyr Tyr Ala
GAC TTG CTC CAG GAG AAG GCG AGC CCG AGG GCG GCG GCG GAG GAG AGG AGC GAC GAA GAG TAC TAC GCC 300
110 Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Pro Ser Glu Thr Val Cys Pro Val Val Thr Thr Pro Ser
AAG CAG GTT TAC AAA ATA GAC ATG CCG CCC TTC TTC CCC TCC GAA ACT GTC TGC CCA GTT GTT ACA ACA CCC TCT 375
135 Gly Ser Val Gly Ser Leu Cys Ser Arg Gln Val Ser Gln Val Leu Cys Gly Tyr Leu Asp Ala Ile Pro Pro Thr Phe
GGC TCA CTG GGC AGC TTG TGC TCC AGA CAG TCC CAG GTG CTC TGT GGG TAC CTT GAT GCC ATC CCG CCC ACT TTC 450
160 Tyr Arg Pro Thr Phe Arg Ile Val Arg Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala
TAC AGA CCC TAC TTC AGA ATT GTT CGA TTT GAC GTC TCA GCA ATG GAG AAG AAT GCT TCC AAT TTG GTG AAA GCA 525
185 Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu
GAG TTC AGA GTC TTT CGT TTG CAG AAC CCA AAA GCC AGA GTG CCT GAA CAA CCG ATT GAG CTA TAT CAG ATT CTC 600

FIG. 1a

210
 Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu Gly Glu
 AAG TCC AAA GAT TTA ACA TCT CCA ACC CAG CGC TAC ATC GAC AGC AAA CTT GTG AAA ACA AGA GCA GAA GGC GAA 675
 C
 235
 Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile
 TGG CTC TCC TTC GAT GTA ACT GAT GCT GCT CAT GAA TGG CTT CAC CAT AAA GAC AGG AAC CTG GGA TTT AAA ATA 750
 T
 260
 Ser Leu His Cys Pro Cys TGC TGC TGC ACT TTT GTA CCA TCT AAT AAT TAC ATC ATC CCA AAT AAA AGT GAA GAA CTA GAA 825
 * 270
 T
 285
 Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys
 GCA AGA TTT GCA GGT ATT GAT GGC ACC TCC ACA TAT ACC AGT GGT GAT CAG AAA ACT ATA AAG TCC ACT AGG AAA 900
 310
 Lys Asn Ser Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Pro Ser Tyr Arg Leu Glu Ser Gln Gln Thr Asn
 AAA AAC AGT GGG AAG ACC CCA CAT CTC CTG CTA ATG TTA TTG CCC TCC TAC AGA CTT GAG TCA CAA CAG ACC AAC 975
 335
 Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu
 CGG CCG AAG AAG CGT GCT TTG GAT GCG GCC TAT TGC TTT AGA AAT GTG CAG GAT AAT TGC TGC CTA CGT CCA CTT 1050
 345
 6
 360
 Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala
 TAC ATT GAT TTC AAG AGG GAT CTA GGG TGG AAA TGG ATA CAC GAA CCC AAA GGG TAC AAT GCC AAC TTC TGT GCT 1125
 A
 385
 Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro
 GCA GCA TGC CCG TAT TTA TGG AGT TCA GAC ACT CAG CAC AGC AGG GTC CTG AGC TTA TAT AAT ACC ATA AAT CCA 1200
 410
 Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr
 GAA GCA TCT GCT TCT CCT TGC TGC GTG TCC CAA GAT TTA GAA CCT CTA ACC ATT CTC TAC TAC ATT GGC AAA ACA 1275
 C
 435
 Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser ***
 CCC AAG ATT GAA CAG CTT TCT AAT ATG ATT GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TAA AATTTCTGAAAAGTGGCAGACCCAAA 1356
 442

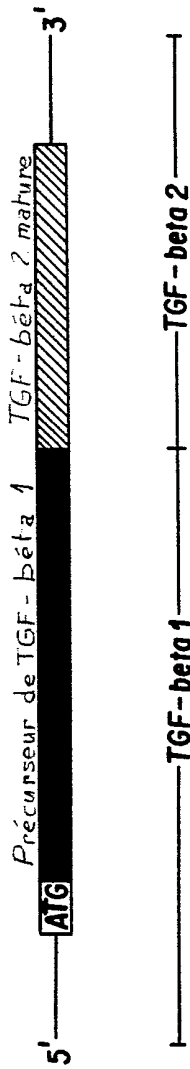
FIG.10 (Suite 1)

ATGACAATGATGATGATAATGATGATGACGACACACGATGATGCTTGTAAACAAGAAAACATAAGAGAGCCCTTGGTTTCATCAGTGTAAAAAATTTTT 1456
 GAAAAGGGGTACTAGTTCAGACACTTGGAACTTGTGTTCTGTTTAAACTGGCATCTGACACAAAAAAGTTGAAGCCCTTATTCTACATTTTC 1556
 ACCTACTTTGTAAGTGAGAGACAGAAGCAAAATTTTTTTAAAGAAAAAATAAACACTGGAGAAATTTATTAGTGTAAATTTATGTGAACAACCGACA 1656
 ACAACAACAACAACAACAAGGAAATCCCATTAAGTGGAGTTGCTGACGTACCGTTCCCTATCCCGCGCCCTCACTTGAATTTTTCTGTATTGCTATG 1756
 CAATAGGCCACCCCTTCCCATTCTTACTCTTAGAGTTAACAGTGAGTTATTTATTGTGTGTTACTATATAATGAACGTTTCATTTGCCCTTGGAAAAATAAAA 1856
 CAGERTATAAAGTGGAGACCAATACTTTGCCAGAACTCATGGATGGCTTAAGGAACTTGAACCTCAACGAGCCAGAAAAAAGAGGTCATATTTAAT 1956
 GGGATGAAAACCCCAAGTGAGTTATTATATGACCGAGAAAGTCTGCATTAAAGATAAAGACCCTGAAAACACACATGTTATGTATCAGCTGCCCTAAGGAAGCT 2056
 TCTTGTAAAGGTCCAAAACCTAAAAGACTGTTAATAAAGAAACTTTTCAGTCAG (poly A) 2111

3/13

2621324

FIG. 1a (Suite 2)



Gène hybride du précurseur de TGF- β 1,2

FIG.1c

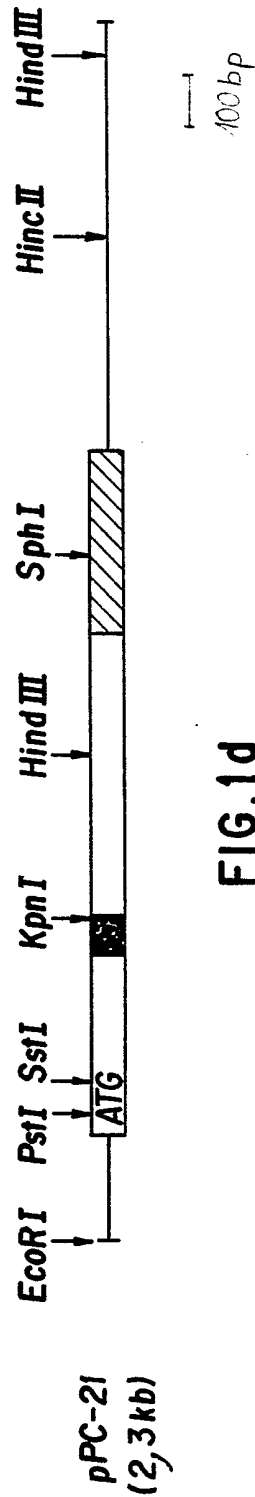
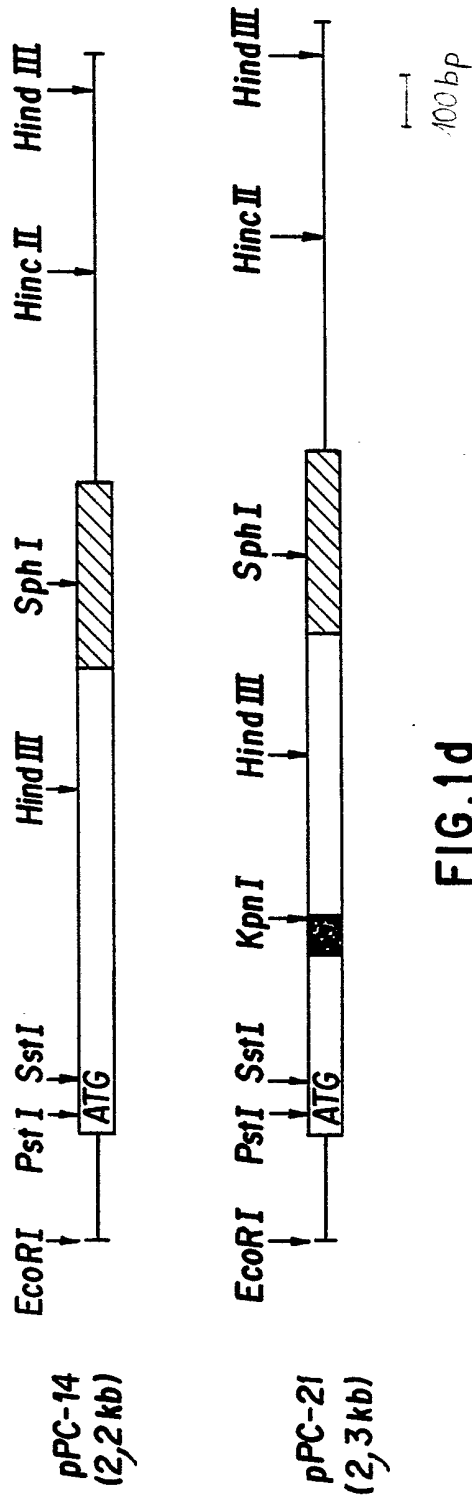


FIG.1d

101 Thr Val Cys Pro Val Val Thr Thr Pro Ser Gly Ser Val Gly Ser leu Cys Ser Arg Gln Ser Gln Val Leu Cys Gly Tyr Leu Asp
 ACT GTC TGC CCA GTT GTT ACA ACA ACA CCC TCT GGC TCA GTG GGC AGC TTG TGC TCC AGA CAG TCC CAG GTG CTC TGT GGG TAC CTT GAT

115 Phe Pro Ser Glu Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val
 AAG GAG CTT TAC AAA ATA GAC ATG CCG CCC TTC TTC CCC TCC GAA AAT GCC ATC CCG CCC ACT TTC TAC AGA CCC TAC TTC AGA ATT GTT

130 pPC-14
 (2,2kb)

pPC-21
 (2,3kb)

KpnI

FIG. 1e

Beta 1 1 M P P S C L R L L P L L P L L W L L V L T P G P P A A G L S T C K T I D M E L V K R K R I
 Beta 2 1 M H Y C V L S A - F L I L H L V T - - - - - V A L S L S T C S T L D M D Q F M R K R I
 Beta 1 47 F A I R G Q I L S K L R L A S P P S Q G E V P P G P L P P E A V L A L Y N S T R D R V A G E S
 Beta 2 38 E A I R G Q I L S K L K L T S P P - E D Y P E P E E V P P E V I S I Y N S T R D L L Q E K A
 Beta 1 93 - - - A E P E P E - P E A D Y Y A K E V T R V L M V E T H N E I Y D K F K Q S T H S - - -
 Beta 2 83 S R R A A A C E R E R S D E E Y Y A K E V Y K I D H P P F P P S E T V C P V T T P P S G S V
 Beta 1 131 - - - - - - - - - - - - - - - I Y M F F N T S E L R E A V P P E P V L - - L S R
 Beta 2 129 G S L C S R Q S V L C G Y L D A I P P T F Y R P Y F R I V R F D V S A M E K N A S N L V K
 Beta 1 153 A E L R L R L - - K L K V - E Q H V E L V Q - - - - - K Y S N N S W R Y L S N R L L A P
 Beta 2 175 A E F R V F R L Q N P K A R V P E Q R I E L Y Q I L K S K D L T S P T Q R Y I D S K V V K T
 Beta 1 191 S D S P E W L S F D V T G V V R Q W L S R G G E I E G F R L S A H C S C D S - - - - -
 Beta 2 221 R A E G E W L S F D V T D A V H E W L H H K D R N L G F K I S L H C P C C T F V P S N Y I
 Beta 1 229 * - - R D N T L Q V D I N G - - - - - F T T G R R G D L A T I H G M N - - - R P F L L L M
 Beta 2 267 I P N K S E E L E A R F A G I D G T S T Y T S G D Q K T I K S T R K K N S G K T P H L L L M
 Beta 1 263 A T P L E R A Q Q H L Q S S K H K R A L D T N Y C F S S T E K N C C V R Q L Y I D F R K D L
 Beta 2 313 L L P S Y R L E S Q Q T N K R K R A L D A A Y C F R N V Q D N C C L R P L Y I D F K R D L
 Beta 1 309 G W K W I H E P K G Y H A N F C L G P C P Y I W S L D T Q Y S K V L A L Y N Q H N P P G A S A
 Beta 2 359 G W K W I H E P K G Y N A N F C A G A C P Y L W S S D T Q H S R V L S L Y N T I N P E A S A
 Beta 1 355 A P C C V P I Q A L E P L P I V Y Y V G R K P K V E Q L S N M I V R S C K C S
 Beta 2 405 S P C C V S Q D L E P L T I L Y Y I G K T P K I E Q L S N M I V S C K C S

FIG. 2a

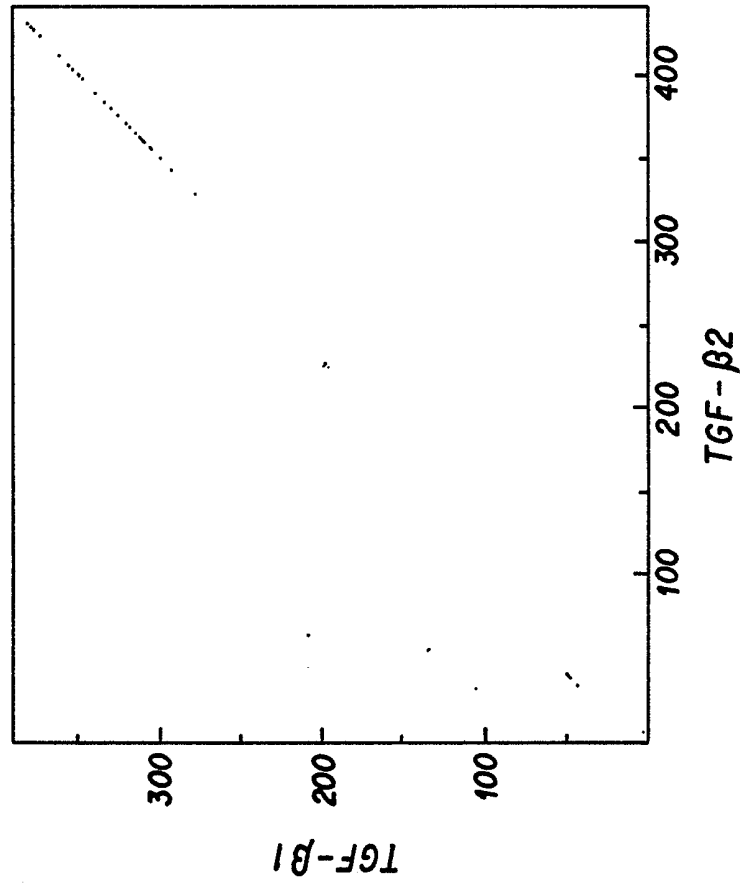


FIG. 2b

15
/13

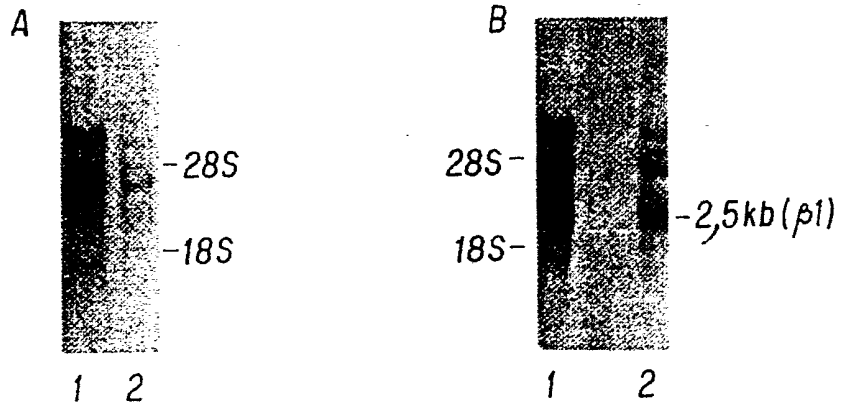


FIG. 3

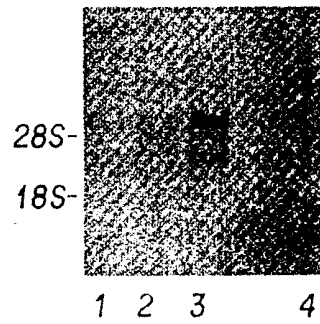


FIG. 4

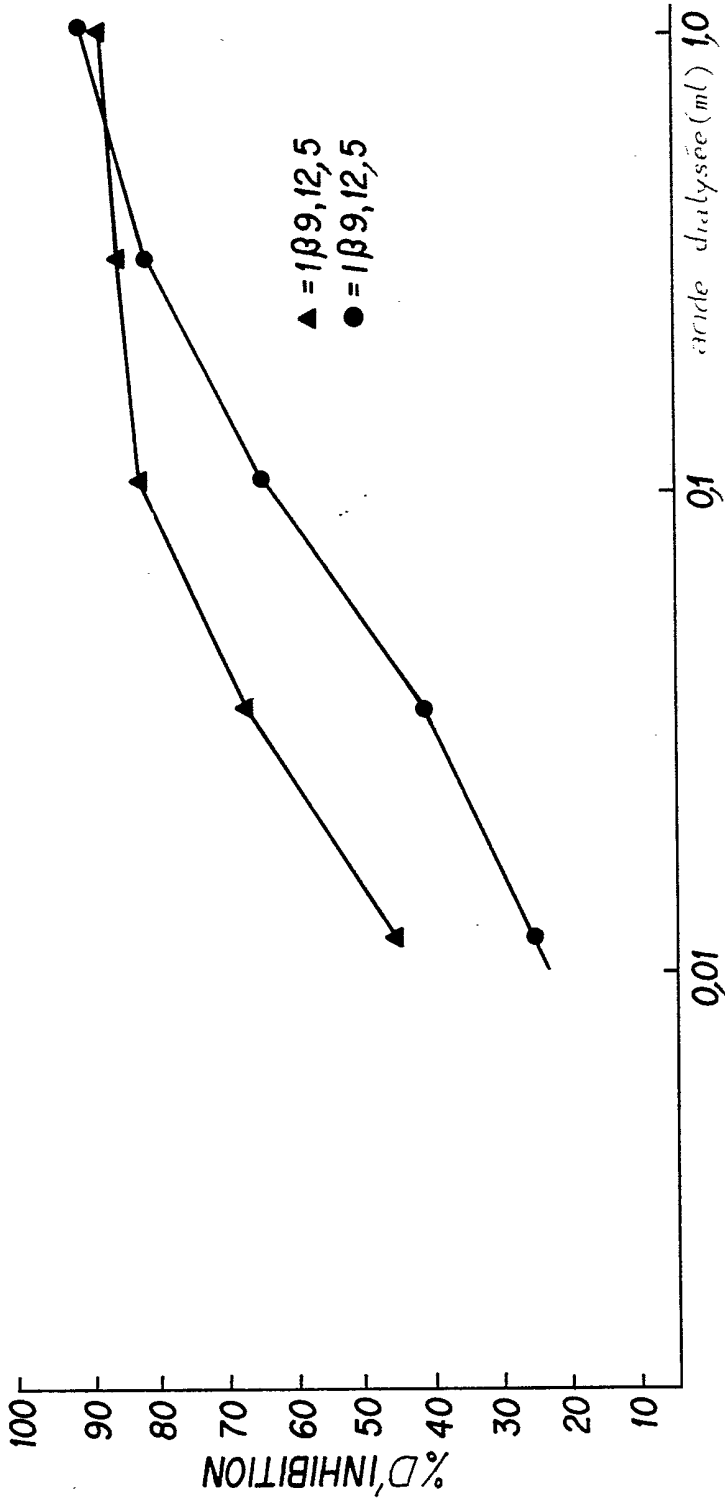
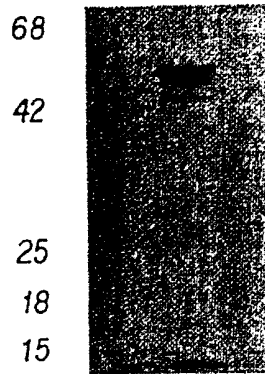


FIG. 5

13/
13



1 2

1) authentic α_2
2) supernatant of cells
1/2 9/25 de no 36 (032)

FIG. 6