



MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

N° 898.016

Classif. Internat.:

C 12 P / C 12 N / A 6 1 K

Mis en lecture le:

15 -02- 1984

LE Ministre des Affaires Economiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;**Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;**Vu le procès-verbal dressé le 18 octobre 1983 à 15 h. 40*

au service de la Propriété Industrielle

ARRÊTE :

Article 1. - Il est délivré à la Sté dite : CETUS CORPORATION
1400 Fifty-Third Street, Emeryville, California
94608, (Etats-Unis d'Amérique)

repr. par l'Office Kirkpatrick-G.C. Plucker à Bruxelles

un brevet d'invention pour: Mutéines appauvries en cystéine provenant
de protéines biologiquement actives

qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de
brevet déposées aux Etats-Unis d'Amérique le 19 octobre
1982, n° 435.154 et le 15 avril 1983, n° 486.162
au nom de D.F. Mark, L.S. Lin et Shi-da Yu Lu dont
elle est l'ayant cause

Article 2. - Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 14 novembre 19 83

PAR DELEGATION SPECIALE:

Le Directeur

L. WUYTS

MÉMOIRE DESCRIPTIF

DÉPOSÉ A L'APPUI D'UNE DEMANDE

DE

BREVET D'INVENTION

FORMÉE PAR

CETUS CORPORATION

p o u r

Mutéines appauvries en cystéine provenant de protéines biologiquement actives.

Demandes de brevets aux Etats-Unis d'Amérique N° 435.154
du 19 octobre 1982 et N° 486.162 du 15 avril 1983 en
faveur de David F. MARK, Leo S. LIN et Shi-Da Yu LU.

L'invention est du domaine général de la technologie de l'ADN recombinant. Plus précisément, elle concerne des protéines biologiquement actives, modifiées par mutation, qui diffèrent de leurs analogues parents par une ou plusieurs
5 substitutions/suppressions de reste cystéine.

Des protéines biologiquement actives qui sont produites par voie microbienne selon la technologie de l'ADN recombinant (ADNr), peuvent contenir des restes cystéine qui ne sont pas essentiels à leur activité, mais sont libres de
10 former des liaisons intermoléculaires ou intramoléculaires indésirables. Une telle protéine est le béta-interféron humain produit par voie microbienne (IFN- β). Au cours de la préparation de l'IFN- β par des techniques avec l'ADNr, on a observé la formation de dimères et d'oligomères
15 d'IFN- β , produit par voie microbienne, dans des extraits de E.coli contenant des concentrations élevées en IFN- β . Cette formation de multimères rend la purification et la séparation de l'IFN- β très laborieuses et longues et nécessite plusieurs autres opérations dans les procédés de puri-
20 fication et d'isolement, tels que la réduction de la protéine pendant la purification et la ré-oxydation pour lui redonner sa conformation originale, augmentant ainsi la possibilité d'une formation incorrecte de liaison disulfure. De plus, on a également trouvé que l'IFN- β produit par voie micro-
25 bienne montrait une activité spécifique constamment faible, due peut-être à la formation de multimères ou de ponts disulfure intramoléculaires désordonnés. Il serait donc souhaitable de pouvoir modifier les protéines biologiquement actives, produites par voie microbienne, telles que l'IFN- β ,
30 d'une manière qui n'affecte pas leur activité, mais qui réduise ou élimine leur aptitude à former des réticulations intermoléculaires ou des liaisons intramoléculaires qui obligent la protéine à adopter une structure tertiaire indésirable (par exemple, une conformation qui diminue l'acti-
35 vité de la protéine).



L'invention a pour but de produire par des techniques de mutagénèse dirigée des protéines biologiquement actives, modifiées par mutation (ces protéines sont appelées "mutéines", Glossary of Genetics and Cytogenetics, 4ème
5 édition, p. 381, Springer-Verlag (1976)), qui conservent l'activité de leurs analogues parents, mais ne sont plus capables de former des liaisons intermoléculaires ou des liaisons disulfure intramoléculaires indésirables. A cet égard, Shepard H.M., et al, Nature (1981) 294, 563-565,
10 décrit une mutéine d'IFN- β dans laquelle la cystéine en position 141 de sa séquence d'acides aminés (il y a trois cystéines dans l'IFN- β humain natif en les positions 17, 31 et 141, Gene (1980) 10, 11-15 et Nature (1980) 285, 542-547) est remplacée par la tyrosine. Cette mutéine a été
15 obtenue par expression bactérienne d'un gène hybride construit à partir d'un clone d'ADNc d'IFN- β partiel ayant une transition G \rightarrow A sur le nucléotide 485 du gène IFN- β . La mutéine ne possédait pas l'activité biologique de l'IFN- β natif, ce qui a autorisé les auteurs à conclure
20 que la cystéine remplacée était essentielle à l'activité.

Les techniques de mutagénèse dirigée sont bien connues et ont été revues par Lather R.F. et Lecoq J.P. dans Genetic Engineering, Academic Press (1983), pages 31-50. La mutagénèse dirigée sur oligonucléotide a fait l'objet
25 d'une revue spécifique par Smith M. et Gillam S. dans Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981), 3, 1-32.

Selon un de ses aspect, l'invention fournit une mutéine synthétique d'une protéine biologiquement active ayant au
30 moins un reste cystéine, capable de former une liaison disulfure et qui n'est pas essentiel à l'activité biologique, caractérisée en ce que la mutéine a au moins un des restes cystéine supprimé ou remplacé par un autre acide aminé.

Selon un autre de ses aspects, l'invention fournit des
35 gènes structuraux synthétiques possédant des séquences d'ADN, spécifiquement conçues ("gènes construits") pour

7

coder pour les mutéines synthétiques décrites ci-dessus.
 Des aspects secondaires de cet aspect concernent des vecteurs
 d'expression qui comprennent des gènes construits structuraux,
 des cellules hôtes ou des organismes transformés avec ces
 5 vecteurs, et des procédés pour produire la mutéine synthétique
 par culture des produits de transformation ou de leur
 descendance et récupérer la mutéine à partir de la culture.
 Dans le cas de mutéines qui présentent une utilité théra-
 peutique, des compositions thérapeutiques qui contiennent
 10 des quantités thérapeutiquement efficaces des mutéines
 constituent un autre aspect de l'invention.

Selon un autre de ses aspects, l'invention fournit
 un procédé pour empêcher qu'une protéine ayant un ou plusieurs
 restes cystéine, capables de former une liaison disulfure
 15 indésirable, ne forme une telle liaison, lequel procédé est
 caractérisé en ce que la protéine est modifiée par mutation,
 par suppression des restes cystéine ou leur remplacement
 par d'autres acides aminés.

Selon encore un autre de ses aspects, l'invention
 20 fournit un procédé pour la production du gène structural
 synthétique, décrit ci-dessus, par une mutagénèse dirigée
 sur un oligonucléotide, lequel procédé est caractérisé en ce
 qu'il comporte les opérations suivantes:

(a) hybridation d'un ADN mono-caténaire comprenant une
 25 chaîne d'un gène structural qui code pour la protéine
 parente, avec un primaire oligonucléotide mutant qui est
 complémentaire d'une région de la chaîne qui comprend le
 codon pour la cystéine à supprimer ou à remplacer ou le
 triplet "non-sens" apparié avec le codon, selon le cas,
 30 à l'exception d'un mauvais assortiment avec le codon ou
 le triplet "non-sens", selon le cas, qui définit une suppres-
 sion du codon ou d'un triplet qui code pour l'autre acide
 aminé;

(b) allongement du primaire avec l'ADN polymérase pour
 35 former un hétéroduplex de mutation; et

(c) répllication de l'hétéroduplex de mutation.



Les primaires oligonucléotides mutants utilisés dans ce procédé sont un autre aspect de l'invention.

Aux dessins annexés, on a représenté:

- figure 1, un diagramme de la séquence d'acides aminés de
5 IFN- β ;
- figure 2, un schéma illustrant la préparation d'un gène
IFN- β mutant par mutagénèse dirigée sur un oligonucléotide;
- figure 3, un diagramme d'un plasmide p β l_{trp} comprenant
le gène IFN- β ;
- 10 figure 4, un diagramme du clonage du phage vecteur
M13mp8;
- figure 5, la carte de restriction du clone M13- β 1;
- figure 6, l'image sur gel du gène IFN- β _{ser17} mutant,
montrant un seul changement de base dans la région codante;
- 15 figure 7, un diagramme du plasmide d'expression pTrp3;
- figure 8a, le mode de restriction HinfI du clone pSY2501
et figure 8b, les deux fragments résultant 169bp et 28bp;
- figure 9, une carte de restriction du clone pSY2501;
- figure 10, la séquence d'ADN codant pour la mutéine
20 IFN- β _{ser17} avec la séquence d'acides aminés correspondante;
- figure 11, la simple bande de la protéine à 18 000 daltons
correspondant à IFN- β _{ser17} dans les extraits des clones
pSY2501 et p β l_{trp};
- figure 12, un diagramme du plasmide pLW1 qui contient le
25 gène interleukine-2 (IL-2) humaine, sous le contrôle du
promoteur E.Coli trp;
- figure 13, une carte de restriction du clone du phage
M13-IL2;
- figure 14, une carte de restriction du plasmide pLW46;
- 30 figures 15a et 15b, la séquence de nucléotides de la
chaîne codante du clone pLW46 et la séquence des acides
aminés correspondants de la mutéine IL-2 appelée IL-2_{ser125}.

Modes opératoires pour appliquer l'invention

L'invention fournit des mutéines de protéines biologi-
35 quement actives dans lesquelles les restes cystéine qui ne
sont pas essentiels à l'activité biologique ont été délibé-



rément supprimés ou remplacés par d'autres acides aminés pour éliminer des sites de réticulation intermoléculaire ou de formation incorrecte de liaison disulfure intramoléculaire; des gènes mutants codant pour ces mutéines; et des
 5 procédés pour produire ces mutéines.

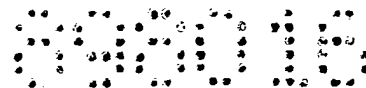
Des protéines qui peuvent être modifiées par mutation selon l'invention peuvent être identifiées à partir d'une information concernant le teneur en cystéine des protéines biologiquement actives et les rôles joués par les restes
 10 cystéine quant à l'activité et à la structure tertiaire. Dans le cas de protéines au sujet desquelles on ne dispose pas d'une telle information dans la littérature, cette information peut être obtenue en modifiant systématiquement chaque reste de cystéine de la protéine par les modes
 15 opératoires décrits ici et en déterminant l'activité biologique des mutéines résultantes et leur tendance à former des liaisons disulfure intermoléculaires ou intramoléculaires indésirables. En conséquence, bien que l'invention soit décrite spécifiquement et illustrée par les exemples
 20 ci-dessous concernant des mutéines d'IFN- β et de IL-2, il est évident que les enseignements suivants s'appliquent également à toute autre protéine biologiquement active qui contient un reste cystéine fonctionnellement non-essentiel qui rend la protéine capable de former une liaison
 25 disulfure indésirable. Comme exemples de protéines autres que IFN- β et IL-2 qui peuvent subir une modification par mutation selon l'invention, on citera la lymphotoxine (facteur de nécrose tumorale) et le facteur-1 stimulant les colonies, et IFN- α 1. Ces protéines
 30 ont normalement un nombre impair de restes cystéine.

Dans le cas de IFN- β , on a rapporté dans la littérature que les IFN glycosylé et non-glycosylé montrent des activités spécifiques qualitativement semblables et qu'en conséquence, les parties glycosyle ne sont pas impliquées
 35 dans et ne contribuent pas à l'activité biologique d'IFN- β . Mais l'IFN- β produit par voie bactérienne, qui ne contient

pas d'unités glycosyle, montre constamment une activité
spécifique quantitativement inférieure à celle d'IFN-
qui est glycosylé. L'IFN- β est connu pour posséder trois
restes cystéine en les positions 17, 31 et 141. Shepard et
5 al, ci-dessus, ont démontré que la cystéine 141 est essen-
tielle pour l'activité biologique. Dans l'IFN- β , qui con-
tient quatre restes cystéine, il y a deux liaisons -S-S-
intramoléculaires; l'une entre cys 29 et cys 138 et l'autre
entre cys 1 et cys 98. A partir de l'homologie entre IFN- β
10 et IFN- α , cys 141 d'IFN- β pourrait être impliqué dans une
liaison -S-S- intramoléculaire avec cys 31, laissant cys 17
capable de former des réticulations intermoléculaires.
En supprimant cys 17 ou en le remplaçant par un autre acide
aminé, on peut alors déterminer si cys 17 est essentiel à
15 l'activité biologique et quel est son rôle dans la forma-
tion de liaison -SS-. Si cys 17 n'est pas essentiel pour
l'activité biologique de la protéine, la protéine sans cys 17
ou dans laquelle on a remplacé cys 17, résultante, pourrait
montrer une activité spécifique proche de celle d'IFN- β
20 natif et ceci pourrait faciliter également l'isolement
et la purification de la protéine.

En utilisant le procédé de mutagénèse dirigé sur oligo-
nucléotide, avec un primaire oligonucléotide synthétique complémentaire
de la région du gène IFN- β au codon pour cys 17, mais qui
25 contient des modifications de base simple ou multiple dans
ce codon, il est possible de produire un gène "construit"
en remplaçant cys 17 par un autre acide aminé choisi.
Lorsqu'on désire une suppression, le primaire oligonucléotide
ne possède pas de codon pour cys 17. La conversion de cys 17
30 en des acides aminés neutres tels que la glycine, la valine,
l'alanine, la leucine, l'isoleucine, la tyrosine, la phényl-
alanine, l'histidine, le tryptophane, la sérine, la thréo-
nine et la méthionine constitue l'approche préférée. La
sérine et la thréonine sont les acides aminés de remplacement
35 particulièrement préférés en raison de leur analogie chimi-
que avec la cystéine. Lorsque la cystéine est supprimée,

7



la mutéine mature est plus courte d'un acide aminé que la protéine parente native ou l'IFN- β produit par voie microbienne.

L'IL-2 humaine est connue pour avoir trois restes cystéine en les positions 58, 105 et 125 de la protéine.

5 Comme dans le cas d'IFN- β , IL-2 se présente sous une forme oligomère agrégée après isolement à partir de cellules bactériennes et doit être réduite par des agents réducteurs pour obtenir un bon rendement à partir des extraits bactériens. De plus, la protéine IL-2 réduite, purifiée, est
10 instable et se réoxyde facilement au stockage en une forme oligomère inactive. La présence de ces trois cystéines signifie que par réoxydation la protéine peut former au hasard l'un des trois ponts disulfure intramoléculaires possibles, l'un seulement d'entre eux étant le pont correct
15 trouvé dans la molécule native. Etant donné qu'on ne connaît pas la structure disulfure de la protéine IL-2 native, il est possible d'utiliser l'invention pour créer des mutations aux codons 58, 105 et 125 du gène IL-2 et identifier les résidus de cystéine qui sont nécessaires pour l'activité,
20 et par conséquent les plus probables à impliquer dans la formation du pont disulfure natif. De la même manière, le reste cystéine qui n'est pas nécessaire pour l'activité, peut être modifié de manière à éviter la formation de ponts disulfure intramoléculaires incorrects et minimiser le
25 risque de ponts disulfure intermoléculaires en éliminant ou en remplaçant le résidu cystéine libre.

La dimension du primaire oligonucléotide est déterminée par la nécessité d'une hybridation stable du primaire dans la région du gène où la mutation doit être induite et
30 par les limites des procédés actuellement disponibles pour synthétiser des oligonucléotides. Les facteurs à considérer dans la constitution d'oligonucléotides utilisables dans la mutagenèse dirigée sur un oligonucléotide (par exemple dimension globale, dimensions des portions adjacentes au
35 site de mutation) sont décrits par Smith M. et Gillam S., ci-dessus. De manière générale, la longueur totale de l'oli-

7

gonucléotide doit permettre d'optimiser une hybridation unique, stable sur le site de mutation, les extensions 5' et 3' à partir du site de mutation ayant une dimension suffisante pour éviter que la mutation ne soit dirigée par l'activité exonucléase de l'ADN polymérase. Les oligonucléotides utilisés pour la mutagénèse selon l'invention contiennent normalement environ de 12 à 24 bases, de préférence environ de 14 à 20 bases et avantageusement environ de 15 à 18 bases. Ils contiennent normalement au moins environ trois bases 3' du codon modifié ou manquant.

Le procédé pour préparer le gène IFN- β modifié implique de manière générale l'induction d'une mutagénèse spécifique d'un site dans le gène IFN- β au codon 17 (TGT) au moyen d'un primaire oligonucléotide synthétique qui omet le codon ou le modifie de manière à ce qu'il code pour un autre acide aminé. Lorsque la thréonine remplace la cystéine et que le primaire est hybridé avec la chaîne "non-sens" du gène IFN- β , le nucléotide primaire préféré est GCAATTTTCACTCAG (la partie soulignée représente le codon modifié). Lorsqu'il est souhaitable de supprimer la cystéine, le primaire préféré est AGCAATTTTCAGCAGAAGCTCCTG qui omet le codon TGT pour cys. Lorsque la cystéine est remplacée par la sérine, on choisit de préférence un primaire à 17 nucléotides, GCAATTTTCAGAGTCAG, qui comprend un codon AGT pour la sérine. La transition T \rightarrow A de la première base dans le codon 17 cys se traduit par le remplacement de la cystéine par la sérine. Il faut reconnaître que lorsqu'on introduit des suppressions, le système de lecture convenable pour la séquence d'ADN doit être maintenu pour l'expression de la protéine désirée.

Le primaire est hybridé avec un phage mono-caténaire tel que M13, fd ou ϕ X174 dans lequel on a cloné une chaîne du gène IFN- β . Il faut noter que le phage peut porter la chaîne "qui a un sens" ou la chaîne "non-sens" du gène. Lorsque le phage porte la chaîne "non-sens", le primaire est identique à la région de la chaîne "qui a un sens", qui

7

contient le codon à muter, si ce n'est un mauvais assortiment avec ce codon, qui définit une suppression du codon ou un triplet qui code pour un autre acide aminé. Lorsque le phage porte la chaîne "qui a un sens", le primaire est complémentaire de la région de la chaîne "qui a un sens", qui contient le codon qui doit être muté, si ce n'est un mauvais assortiment approprié dans le triplet qui est apparié avec le codon à supprimer. Les conditions utilisables dans l'hybridation sont décrites par Smith M. et Gillam S., ci-dessus. La température est normalement comprise entre 0 et 70°C, de préférence entre 10 et 50°C. Après l'hybridation, le primaire est prolongé sur l'ADN du phage par réaction avec l'ADN polymérase I, la T₄ ADN polymérase, la reverse transcriptase ou d'autres ADN polymérases appropriées. L'ADN bicaténaire résultant est converti en ADN bicaténaire circulaire fermé, par traitement avec une ADN ligase telle que la T₄ ADN ligase. Les molécules d'ADN contenant des régions mono-caténares peuvent être détruites par un traitement avec la S1 endonucléase.

Une mutagénèse dirigée sur un oligonucléotide peut être également utilisée pour produire un gène IL-2 mutant qui code pour une protéine ayant une activité IL-2, mais dont cys 125 est changé en sérine 125. Le primaire oligonucléotide utilisé dans la production de ce gène IL-2 mutant lorsque le phage porte la chaîne "qui a un sens" du gène, est GATGATGCTTCTGAGAAAAGGTAATC. Cet oligonucléotide comporte un changement C → G sur la base centrale sur le triplet qui est apparié avec le codon 125 du gène IL-2.

L'hétéroduplex de mutation résultant est alors utilisé pour transformer un organisme ou une cellule hôte compétent. La réplique de l'hétéroduplex par l'hôte fournit des descendants à partir des deux chaînes. Après la réplique, le gène mutant peut être isolé à partir des descendants de la chaîne mutante, inséré dans un vecteur d'expression approprié, puis le vecteur utilisé pour transformer un organis-

me ou cellule hôte approprié. Comme vecteurs appropriés, on citera les plasmides pBR322, pCR1 et leurs variantes, des vecteurs synthétiques et autres. Des organismes hôtes appropriés sont E.coli, Pseudomonas, Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, différentes souches de levures, Bacillus thermophilus, des cellules animales telles que des cellules de souris, de rat ou d'ovaires d'hamster de Chine (CHO), des cellules végétales, des hôtes animaux et végétaux et similaires. Il faut noter que lorsqu'un hôte choisi est transformé avec le vecteur, des séquences promoteur-opérateur appropriées sont également introduites de manière à exprimer la mutéine. Les hôtes peuvent être procaryotes ou eucaryotes (des procédés pour l'insertion d'ADN dans des cellules eucaryotes sont décrits dans les "PCT applications", n° US81/00239 et US81/00240, publiés le 3 septembre 1981). Les hôtes préférés sont E.coli et les cellules CHO. Les mutéines obtenues selon l'invention peuvent être glycosylées ou non-glycosylées, selon la glycosylation se produisant dans la protéine parente native et l'organisme hôte utilisé pour produire la mutéine. Si celà s'avère souhaitable, une mutéine non-glycosylée obtenue lorsque l'organisme hôte est E.coli ou un Bacillus peut être éventuellement glycosylée in vitro par voie chimique, enzymatique ou par d'autres types de modifications connus dans la technique.

Dans le mode de réalisation préférée de l'invention relative à IFN- β , le reste cystéine en position 17 dans la séquence d'acides aminés d'IFN- β , tel que représenté sur la figure 1 des dessins annexés, est changé en sérine par une transition T \rightarrow A de la première base du codon 17 de la chaîne "qui a un sens" de la séquence d'ADN qui code pour IFN- β mature. La mutagénèse spécifique du site est induite au moyen d'un primaire à 17 nucléotides GCAATTTTCAGAGTCAG, identique à la séquence de 17 nucléotides de la chaîne "qui a un sens" d'IFN- β dans la région du codon 17, si ce n'est un mauvais assortiment d'une

simple base sur la première base du codon 17. Le mauvais assortiment est sur le nucléotide 12 dans le primaire. Il faut noter que le code génétique est dégénéré et que de nombreux acides aminés peuvent être codés par plus d'un codon.

5 Le code de base pour la sérine, par exemple, est dégénéré de 6 manières, et donc les codons TCT, TCG, TCC, TCA, AGT et ACG codent tous pour la sérine. Le codon AGT a été choisi par convenance pour le mode de réalisation préféré. De même, la thréonine est codée par l'un quelconque des codons ACT,

10 ACA, ACC et ACG. Il est entendu que lorsqu'un codon est spécifié pour un acide aminé particulier, il comprend tous les codons dégénérés qui codent pour cet acide aminé. Le mer17 est hybridé avec un ADN provenant d'un phage M13 mono-caténaire qui porte la chaîne " non-sens" du gène IFN- β .


15 Le primaire oligonucléotide est alors allongé sur l'ADN au moyen d'un fragment Klenow de l'ADN polymérase I et l'ADN bicaténaire résultant est converti en ADN circulaire fermé avec la T_4 ligase. Une réplique de l'hétéroduplex de mutation résultant donne des clones à partir de la chaîne d'ADN

20 contenant le mauvais assortiment. Des clones mutants peuvent être identifiés et sélectionnés par l'apparition ou la disparition de sites de restriction spécifiques, la résistance ou la sensibilité aux antibiotiques ou par d'autres procédés connus dans la technique. Lorsque la cystéine est remplacée

25 par la sérine, la transition $T \rightarrow A$, représentée sur la figure 2 des dessins annexés, se traduit par la création d'un nouveau site de restriction HinfI dans le gène structural. Le clone mutant est identifié en utilisant l'oligonucléotide primaire comme un modèle dans une sélection par hybridation

30 des plaques de phages mutés. Le primaire comporte un seul mauvais assortiment lorsqu'il est hybridé avec le parent, mais montre un assortiment parfait lorsqu'il est hybridé avec l'ADN du phage muté, tel que représenté sur la figure 2. Les conditions d'hybridation peuvent alors être choisies

35 de telle sorte que le primaire oligonucléotide hybride de préférence avec l'ADN muté, mais pas avec l'ADN parent.



Le nouveau site engendré HinfI sert également comme moyen de confirmation de la simple mutation de base dans le gène IFN- β .

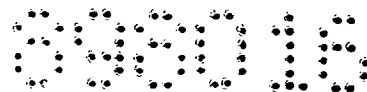
L'ADN du phage M13 portant le gène muté est isolé et
5 adjoint à un vecteur d'expression approprié tel que le
plasmide pTrp3, et la souche MM294 de E.coli est transformée
avec le vecteur. Des milieux de développement appropriés
pour la culture des produits de transformation et de leur
descendance sont connus des spécialistes de la technique.
10 La protéine de IFN- β exprimée est isolée, purifiée et caractérisée.

Les exemples non-limitatifs suivants sont donnés à
titre d'illustration de l'invention. Les exemples 1 à 9
décrivent la préparation d'une protéine de IFN- β . Les ex-
15 emples 10 à 15 décrivent la préparation d'une protéine de
IL-2.

Exemple 1

Clonage du gène IFN- β dans le vecteur M13

L'utilisation du vecteur du phage M13 comme source de
20 copie d'ADN mono-caténaire a été démontrée par G.F. Temple
et al, Nature (1982) 296, pages 537-540. On fait digérer le
plasmide p β 1trp (figure 3) contenant le gène IFN- β sous
contrôle du promoteur trp de E. coli, avec les enzymes de
restriction HindIII et XhoII. On fait digérer l'ADN de la
25 forme répliquée (RF) M13mp8 (figure 4)(J. Messing, "Third
Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA",
Ed. A. Walton, Elsevier Press, 143-153 (1981) avec les
enzymes de restriction HindIII et BamHI, et on mélange avec
l'ADN p β 1trp qu'on a préalablement fait digérer avec
30 HindIII et XhoII. On relie le mélange avec la T₄ ADN ligase
et l'ADN lié est transformé dans des cellules compétentes
de E.coli souche JM 103 et appliqué sur des plaques d'indi-
cateur Xgal(J. Messing et al, Nucleic Acids Res. (1981) 9,
pages 309-321). On rassemble les plaques contenant le
35 phage recombinant (plaques blanches), on inocule dans une
culture fraîche de JM 103 et à partir des cellules infectées



on obtient des mini-préparations de molécules RF (H.D. Birnboim et J. Doly, *Nucleic Acid Res* (1979) 7, 1513-1523).

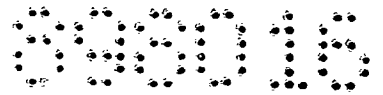
On fait digérer les molécules RF avec différentes enzymes de restriction pour identifier les clones contenant l'insert
5 IFN- β . La carte de restriction d'un tel clone (M13- β 1) est reproduite sur la figure 5 des dessins annexés. On prépare l'ADN mono-caténaire provenant du phage à partir du clone M13- β 1 pour servir de copie pour une mutagenèse spécifique d'un site en utilisant un oligonucléotide
10 synthétique.

Exemple 2

Mutagenèse spécifique d'un site

On traite 40 picomoles de l'oligonucléotide synthétique GCAATTTTCAGAGTCA6 (primaire) avec la T_4 kinase en présence
15 de 0,1 mM d'adénosine triphosphate (ATP), 50 mM de chlorhydrate d'hydroxyméthylaminométhane (Tris-HCl) de pH 8,0, 10 mM de $MgCl_2$, 5 mM de dithiothréitol (DTT) et 9 unités de T_4 kinase, dans 50 μ l à 37°C pendant 1 heure. On hybride le primaire traité avec la kinase (12 pmoles), avec 5 μ g
20 d'ADN M13- β 1 mono-caténaire dans 50 μ l d'un mélange contenant 50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl de pH 8,0, 10 mM de $MgCl_2$ et 10 mM de β -mercaptoéthanol, en chauffant à 67°C pendant 5 minutes et à 42°C pendant 25 minutes. On refroidit le mélange ainsi traité sur de la glace et on ajoute 50 μ l
25 d'un mélange réactionnel contenant 0,5 mM de chacun des désoxynucléoside triphosphates (dNTP), 80 mM de Tris-HCl de pH 7,4, 8 mM de $MgCl_2$, 100 mM de NaCl, 9 unités d'ADN polymérase I, fragment Klenow, 0,5 mM d'ATP et 2 unités de T_4 ADN ligase, on incube à 37°C pendant 3 heures et à 25°C
30 pendant 2 heures. On termine alors la réaction par une extraction au phénol et une précipitation avec de l'éthanol. On dissout l'ADN dans 10 mM de Tris-HCl de pH 8,0, 10 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), 50 % de sucrose et 0,05 % de bleu de bromophénol et on soumet à une
35 électrophorèse sur un gel d'aragose à 0,8 % en présence de 2 μ g/ml de bromure d'éthidium. On élue les bandes d'ADN





NaCl 1,5 M et 0,2 % de Triton X-100 pendant 5 minutes, puis on neutralise en recouvrant avec des papiers filtres imprégnés de 0,5 M de Tris-HCl de pH 7,5 et 1,5 M de NaCl pendant 5 autres minutes. On lave deux fois les filtres de la même manière sur des filtres imprégnés dans SSC x 2. (solution saline de citrate standard, on sèche et on cuit dans une étuve à vide à 80°C pendant 2 heures. On pré-hybride les filtres en double à 55°C pendant 4 heures avec 10 ml par filtre d'un tampon d'hybridation d'ADN (SSC x 5) de pH 7,0, une solution de Denhardt x 4 (polyvinylpyrrolidone, ficoll et albumine sérique bovine, 1 fois = 0,02 % de chacune des substances), 0,1 % de dodécyl sulfate de sodium (SDS), 50 mM de tampon de phosphate de sodium de pH 7,0 et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. On prépare un modèle marqué à ³²P en traitant par une kinase le primaire oligonucléotide avec ATP marqué à ³²P. On hybride les filtres avec 3,5 x 10⁵ cpm/ml de primaire marqué à ³²P dans 5 ml par filtre de tampon d'hybridation d'ADN à 55°C pendant 24 heures. On lave les filtres à 55°C pendant 30 minutes chacun dans des tampons de lavage contenant 0,1 % de SDS et des quantités décroissantes de SSC. On lave initialement les filtres avec un tampon contenant du SSC x 2 et on examine les filtres témoins contenant des plaques de M13-β1 non-muté, quant à la présence d'une radioactivité quelconque, en utilisant un compteur de Geiger. On abaisse progressivement la concentration en SSC et on lave les filtres jusqu'à disparition de toute radioactivité détectable sur les filtres témoins avec des plaques de M13-β1 non-muté. La plus faible concentration en SSC utilisée est de SSC x 0,1. On sèche les filtres à l'air et on les soumet à une autoradiographie à -70°C pendant de 2 à 3 jours. Avec le modèle d'oligonucléotide traité par une kinase, on sélectionne 480 plaques de M13-β1 muté et 100 plaques témoins de M13-β1 non-muté. Aucune des plaques témoins n'hybride avec le modèle, alors que 5 plaques de M13-β1 muté hybrident avec le modèle.



correspondant aux formes RF de M13- β 1 à partir de découpes de gel par le procédé au perchlorate (R.W. Davis et al, "Advanced Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pages 178-179 (1980)). On utilise l'ADN élué pour transformer des cellules compétentes de JM 103, on laisse se développer pendant une nuit et on isole l'ADN mono-caténaire à partir du produit surnageant de la culture. On utilise cet ADN mono-caténaire comme copie dans un second cycle d'extension du primaire, on transforme les formes RF purifiées sur gel, de l'ADN dans des cellules compétentes JM 103, on dépose sur des plaques de gélose et on incube pendant une nuit pour obtenir des plaques de phage.

Exemple 3

Mutagenèse spécifique d'un site

On répète l'expérience de l'exemple 2 ci-dessus, si ce n'est qu'on utilise comme primaire oligonucléotide synthétique GCAATTTTCAGACTCAG pour changer le codon 17 du gène IFN- β en partant d'un codon qui code pour la cystéine pour arriver à un codon qui code pour la thréonine.

Exemple 4

Suppression de la spécificité d'un site

On répète l'expérience de l'exemple 2 ci-dessus, si ce n'est que le primaire oligonucléotide synthétique utilisé est AGCAATTTTCA.GCAGAAGCTCCTG pour supprimer le codon 17 du gène IFN- β .

Exemple 5

Sélection et identification des plaques obtenues par mutagenèse

On refroidit à 4°C des lames contenant des plaques de M13- β 1 muté (exemple 1) ainsi que deux lames contenant des plaques de phage M13- β 1 non-muté et on transfère des plaques de chaque lame sur deux ronds de papier-filtre en nitrocellulose en plaçant un filtre sec sur la lame de gélose pendant 5 minutes pour le premier filtre et 15 minutes pour le second filtre. On place alors les filtres sur des papiers filtres épais imbibés dans NaOH 0,2 N,



On recueille une des 5 plaques de M13- β 1 muté (M13-SY2501) et on inocule dans une culture de JM 103. On prépare un ADN mono-caténaire à partir du liquide surnageant et un ADN bicaténaire à partir du culot de cellules. On utilise
 5 l'ADN monocaténaire comme copie pour la séquence didésoxy du clone avec le primaire universel M13. Le résultat de l'analyse de la séquence est reproduit sur la figure 6, confirmant que le codon cys TGT a bien été converti en un codon ser AGT.

10 Exemple 6

Expression d'IFN- β muté dans E.coli

On fait digérer l'ADN RF de M13-SY2501 avec les enzymes de restriction HindIII et XhoII et on purifie le fragment d'insert 520 bp sur un gel d'agarose à 1 %. On fait digérer
 15 le plasmide pTrp3 contenant le promoteur trp E.coli (figure 7) avec les enzymes HindIII et BamHI, on mélange avec le fragment d'ADN M13-SY2501 purifié et on relie en présence de T₄ ADN ligase. L'ADN ligaturé est transformé dans une souche MM294 de E. coli. On sélectionne les produits de
 20 transformation résistant à l'ampicilline, quant à leur sensibilité au médicament de tétracycline. On fait digérer l'ADN plasmique provenant de 5 clones résistant à l'ampicilline, sensibles à la tétracycline, avec HinfI pour déterminer la présence de l'insert M13-SY2501. La figure 8a reproduit le
 25 mode de restriction par HinfI d'un des clones (pSY2501), le comparant au mode de restriction par HinfI du clone d'IFN- β original, p β ltrp. Comme attendu, on observe un site supplémentaire HinfI dans pSY2501, coupant le fragment interne 197 bp IFN- β en un fragment 169 bp et un fragment
 30 28 bp (figure 8b). Une carte de restriction du clone pSY2501 est reproduite sur la figure 9. La séquence totale d'ADN du gène IFN- β mutant est reproduite sur la figure 10 avec la séquence des acides aminés prévue.

Le plasmide désigné comme le clone pSY2501 est
 35 déposé auprès de l'Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Fermentation Laboratory, Northern Regional

7

Exemple 7

Purification de IFN- β _{ser17}

On recueille IFN- β _{ser17} à partir de E. coli qu'on a transformé pour produire IFN- β _{ser17}. On cultive E.coli dans le milieu de culture suivant à une DO de 10-11 à 680 nm (poids sec 8,4 g.l).

	<u>Ingrédient</u>	<u>Concentration</u>
	NH ₄ Cl	20 mM
	K ₂ SO ₄	16,1 mM
10	KH ₂ PO ₄	7,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	12,2 mM
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	3 mM
	Citrate trisodique, di-hydraté	1,5 mM
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	30 μ M
15	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	30 μ M
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	3 μ M
	L-tryptophane	70 mg/l
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	72 μ M
	Thiamine. HCl	20 mg/l
20	Glucose	40 g/l

Ajustement du pH avec NH₄OH

On refroidit à 20°C 9,9 litres (0,9 kg) de culture de E.coli transformé et on concentre en faisant passer la culture sur un filtre à écoulement transversal sous une chute de pression moyenne d'environ 110 kPa et un débit de filtrat constant de 260 ml/mn jusqu'à ce le filtrat pèse 8,8 kg. On verse le produit concentré (environ un litre) dans une cuve et on refroidit à 15°C. On rompt les cellules dans le produit concentré en le faisant passer sur un homogénéiseur de Manton-Gaulin à 5°C, environ 69 000 kPa. On lave l'homogénéiseur avec un litre de solution saline tamponnée au phosphate, de pH 7,4 (PBS) et on ajoute l'eau de lavage au produit de cellules brisées pour obtenir un volume final de 2 litres. On centrifuge ce volume en continu à 12000 x g à un débit de 50 ml/mn. On sépare le solide du produit sur-

7

Research Center, Science and Education Administration, U.S. Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 60604 et a reçu les numéros d'immatriculation CMCC n° 1533 et NRRL n° B-15356.

5 Les cultures de pSY2501 et p β ltrp, qui comprennent leur descendance, sont poursuivies jusqu'à une densité optique (DO_{600}) de 1,0. On prépare des extraits sans cellules et on détermine l'activité antivirale d'IFN- β sur des cellules de GM2767 dans un micro-titrage. Les extraits du
10 clone pSY2501 montrent une activité de 3 à 10 fois supérieure à celle de p β ltrp (Tableau I), indiquant que le clone pSY2501 a synthétisé plus de protéine montrant une activité IFN- β ou que la protéine obtenue a une activité spécifique supérieure.

15

Tableau I

<u>Extrait</u>	<u>Activité antivirale (U/ml)</u>
pSY2501	6×10^5
p β ltrp	1×10^5
ptrp3 (témoin)	30

20 Pour déterminer si le clone pSY2501 a synthétisé plusieurs fois une protéine plus active, on soumet les extraits des deux clones à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide SDS avec un extrait témoin et on colore le gel avec du bleu de Coomassie pour visualiser les protéines. Comme
25 montré sur la figure 11, on n'observe qu'une seule bande de protéine correspondant à une protéine apparente à 18000 daltons, présente dans les extraits des clones pSY2501 et p β ltrp, mais non dans l'extrait témoin ptrp3. Cette protéine qui a une masse moléculaire d'environ 20 000 daltons, mais
30 montre un mode de migration sur gel d'une protéine de 18 000 daltons, s'est montrée au préalable être IFN- β par purification de cette protéine à partir d'extraits de p β ltrp. Etant qu'il y a une moindre quantité de cette protéine dans les extraits de pSY2501 que dans les extraits de p β ltrp,
35 l'activité spécifique de la protéine dans des extraits du clone pSY2501 est supérieure à celle du clone p β ltrp.

nagent et on remet en suspension dans 4 litres de PBS contenant 2 % en poids de SDS. On agite cette suspension à la température ambiante pendant 15 minutes, après quoi il n'y plus de matériau visible en suspension. On extrait alors la solution avec du 2-butanol dans un rapport volumique 2-butanol/solution de 1:1. On effectue l'extraction dans un séparateur de phases liquide-liquide avec un débit de 200 ml/mn. On sépare alors la phase organique et on évapore à sec pour obtenir 21,3 g de protéine. On remet cette dernière en suspension dans de l'eau distillée dans un rapport volumique de 1:10.

Dans le produit recueilli, on détermine l'activité IFN- β humain au moyen d'un essai basé sur la protection contre l'effet cytopathique viral (CPE). L'essai est effectué sur des plaques de micro-titrage. Dans chaque puits, on introduit 50 μ l de milieu essentiel minimum et dans le premier puits on place 25 μ l de l'échantillon, dans les puits suivants on fait des dilutions en série selon un rapport volumique de 1:3. Sur chaque plaque, on dépose des témoins de virus (stomatite vésiculaire), de cellules (lignée de fibroplastes humains GM-2767) et d'IFN- β . Le témoin IFN- β est utilisé à raison de 100 unités par ml. On irradie ensuite les plaques avec une lumière UV pendant 10 minutes. Après l'irradiation, on ajoute 100 μ l de la suspension de cellules ($1,2 \times 10^5$ cellules/ml) dans chaque puits et on incube les plateaux pendant de 18 à 24 heures. Dans chaque puits, à l'exception du témoin de cellules, on ajoute une solution de virus à raison d'un unité formant une plaque/cellule. On incube les plateaux jusqu'à ce que le témoin de virus montre un CPE de 100 %. Ceci se produit généralement 18 à 24 heures après avoir ajouté la solution de virus. On interprète les résultats de l'essai quant à l'emplacement du puits à 50 % de CPE du témoin IFN- β de référence. On détermine à partir de ce point le titre en interféron pour tous les échantillons sur la plaque. L'activité spécifique du produit recueilli est évaluée à 5×10^7 U/mg.

Exemple 8Précipitation avec un acide et purification chromatographique

On répète le procédé de l'exemple 7, si ce n'est qu'après l'extraction et la séparation des phases aqueuse et organique et le mélange de la phase organique avec du PBS selon un rapport volumique de 3:1, on abaisse le pH du mélange vers 5 par addition d'acide acétique glacial. On sépare le précipité résultant par centrifugation à 10 000 - 17 000 x g pendant 15 minutes et on redissout le culot dans du SDS à 10 % en poids/volume, 10 mM de DTT, 50 mM de tampon d'acétate de sodium de pH 5,5 et on chauffe à 80°C pendant 5 minutes.

On verse ensuite la solution sur une colonne "Aquapore" de Brownlee RP-300, 10 μ M en utilisant un système de gradient de Beckman. Le tampon A est 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) dans H₂O, le tampon B est 0,1 % de TFA dans l'acétonitrile. La détection se fait par absorbance ultraviolette à 280 nm. Le solvant est programmé selon un gradient linéaire de 0 % de tampon B à 100 % de tampon B en 3 heures. On rassemble les fractions contenant les plus fortes activités en interféron et on détermine l'activité spécifique de la préparation d'interféron rassemblée comme étant de $9,0 \times 10^7$ à $3,8 \times 10^8$ unités internationales/mg de protéine, comparée à environ 2×10^8 U/mg pour IFN- β natif.

Exemple 9Caractérisation biochimique de IFN- β Ser₁₇

On détermine les compositions en acides aminés après une hydrolyse de 24 à 72 heures d'échantillons de 40 μ l d'IFN dans 200 μ l de HCl 5,7 N et 0,1 % de phénol, à 108°C. On détermine la proline et la cystéine de la même manière après une oxydation à l'acide performique; dans ce cas, on omet le phénol pour l'hydrolyse. On analyse le tryptophane après une hydrolyse de 24 heures d'échantillons de 400 μ l dans HCl 5,7 N et 10 % d'acide mercaptoacétique (sans phénol). On effectue l'analyse sur un analyseur pour acides aminés

Beckman 121MB en utilisant une simple colonne de résine AA10.

La composition en acides aminés calculée à partir d'hydrolyses acides représentatives de 24, 48 et 72 heures de IFN- β Ser₁₇ purifié concorde bien avec celle prédite par la séquence d'ADN des clones du gène IFN, moins la méthionine N-terminale absente.

On détermine la séquence d'acides aminés des 58 premiers résidus de la terminaison acide aminé d'IFN purifié sur un échantillon de 0,7 mg dans un "Sequanator" Beckman 890C avec un tampon de Quadrol 0,1 M. On détermine les acides aminés de PTH par chromatographie en phase liquide sous haute pression, en phase inversée, sur une colonne d'ultrasphères DDS Altex (4,6 x 250 mm) à 45°C en éluant à 1,3 minute avec 40 % de tampon A et à 8,4 minutes avec de 40 à 70 % de tampon B, le tampon A étant constitué de 0,0115 M d'acétate de sodium et 5 % de tétrahydrofurane (THF), de pH 5,11, et le tampon B de 10 % de THF dans l'acétonitrile.

La séquence d'acides aminés N-terminaux d'IFN- β Ser₁₇, déterminée, correspond à la séquence attendue, prédite à partir de la séquence d'ADN, si ce n'est l'absence de méthionine N-terminale.

Tel qu'indiqué ci-dessus, la préparation d'IFN- β Ser₁₇ montre des taux d'activité spécifique très proches de, ou supérieurs à ceux d'IFN- β natif. IFN- β Ser₁₇ ne contient pas de groupes sulfhydryle libres, mais montre une liaison -S-S- entre les seules cystéines restantes en les positions 31 et 141. La protéine ne forme pas facilement d'oligomères et semble être pratiquement sous la forme monomère.

IFN- β Ser₁₇ obtenu selon l'invention peut être formulé comme un simple produit ou comme des mélanges de diverses formes, dans des préparations pharmaceutiquement acceptables avec des milieux de véhicules non-toxiques, non-allergisants, physiologiquement acceptables, pour des utilisations cliniques et thérapeutiques dans la thérapie du cancer ou dans des conditions où une thérapie par l'interféron est indiquée, et dans le cas d'infections virales. Comme exemples

de ces milieux, on citera sans que la liste en soit exhaustive, l'eau distillée, une solution saline physiologique, une solution de Ringer, une solution de Hank et similaires.

D'autres adjuvants de stabilisation et de solubilisation tels que le dextrose, la HSA (albumine sérique humaine) et autres peuvent être incorporés de manière optimale. Les formulations thérapeutiques peuvent être administrées par voie orale ou parentérale, tel que des administrations intraveineuses, intramusculaires, intrapéritonéales ou souscutanées. Les préparations d'IFN- β modifié de l'invention peuvent également être utilisées pour des applications topiques dans des milieux appropriés, normalement utilisés dans ces cas.

Les principaux avantages de la mutéine de IFN- β décrite ci-dessus résultent de l'élimination d'un groupe sulfhydryle libre en position 17 dans IFN- β , forçant ainsi la protéine à former des liaisons disulfure correctes entre cys 31 et cys 141 et à assumer la conformation ostensiblement requise pour une activité biologique totale. L'activité biologique plus élevée de IFN- β ser17 permet l'emploi de plus faibles doses dans des administrations thérapeutiques. En supprimant la cystéine en position 17 et en éliminant le groupe -SH libre, la protéine IFN- β ser17 ne forme pas de dimères, ni d'oligomères aussi facilement que l'IFN- β produit par voie microbienne. Ceci facilite la purification de la protéine et augmente sa stabilité.

Exemple 10

La séquence de nucléotides pour un clone d'ADNc codant pour la IL-2 humaine, des modes opératoires pour préparer des registres d'ADNc de IL-2 et pour leur sélection quant à IL-2 sont décrits par Taniguchi T. et al, Nature (1983) 24, pages 305 et suivantes.

On obtient des registres d'ADNc enrichis en clones d'ADNc de IL-2, potentiels, à partir de fractions d'ARNm enrichies en IL-2 provenant de lymphocytes sanguins périphériques (PBL) et de cellules de Jurkat, par des procédés classiques. On enrichit l'ARNm quant au message IL-2

7

par un fractionnement de l'ARNm et une identification de la fraction ayant une activité ARNm de IL-2 par injection des fractions dans des oocytes de *Xenopus laevis* et en déterminant l'activité en IL-2 des lysats d'oocytes sur des cellules HT-2 (J. Watson, J. Exp. Med. (1979) 150, pages 1570-1579 et S. Gillis et al, J. Immun. (1978) 120, pages 2027-2032).

Exemple 11

Sélection et identification de clones d'ADNc de IL-2

10 On sélectionne les registres d'ADNc de IL-2 en utilisant le procédé d'hybridation de colonies. On réplique chaque plaque de micro-titrage sur des papiers filtres en nitrocellulose (S & S type BA-85) (essais en double) et on laisse se développer des colonies à 37°C pendant de 14 à 16 heures
15 sur de la gélose L contenant 50 µg/ml d'ampicilline. On lyse les colonies et on fixe l'ADN sur le filtre par un traitement séquentiel pendant 5 minutes avec 500 mM de NaOH, 1,5 M NaCl, on lave deux fois pendant 5 minutes chaque fois avec la solution saline de citrate standard (SSC) 5 fois
20 concentrée. On sèche les filtres à l'air et on cuit à 80°C pendant 2 heures. On pré-hybride les filtres en double à 42°C pendant de 6 à 8 heures avec 10 ml par filtre de tampon d'hybridation d'ADN (50 % de formamide, SSC x 5, pH de 7,0, solution de Denhardt x 5 (polyvinylpyrrolidone, ficoll et
25 albumine sérique bovine; 1 fois = 0,2 % de chacune de ces substances), 50 mM de tampon de phosphate de sodium à un pH de 7,0, 0,2 % de SDS, 20 µg/ml de Poly U et 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé.

On prépare un modèle d'oligonucléotide 20-mère marqué
30 à ³²P d'après la séquence du gène IL-2 rapportée par Taniguchi T. et al, voir ci-dessus. La séquence de nucléotides du modèle est GTGCCTTCTTGGGCATGTA.

On hybride les échantillons à 42°C pendant de 24 à 36 heures avec 5 ml par filtre de tampon d'hybridation d'ADN
35 contenant le modèle d'ADNc marqué à ³²P. On lave les filtres avec 2 fois SSC x 2 et 0,1 % de SDS à 50°C pendant

30 minutes chaque fois, puis on lave avec deux fois SSC x 1, 0,1 % de SDS à 50°C pendant 90 minutes chaque fois, on sèche à l'air et on autoradiographie à -70°C pendant de 2 à 3 jours. On identifie les clones positifs et on les sélectionne de nouveau avec le modèle. On identifie de pleines longueurs de clones et on confirme en établissant une carte d'enzymes de restriction et par comparaison avec la séquence du clone d'ADNc de IL-2 rapportée par Taniguchi T. et al, ci-dessus.

Exemple 12

10 Clonage du gène IL-2 dans le vecteur M13

On clone le gène IL-2 dans M13mp9 tel que décrit dans l'exemple 1 en utilisant le plasmide pLW1 (figure 12) contenant le gène IL-2 sous le contrôle du promoteur trp E.Coli. Un échantillon de pLW1 est déposé dans l'American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Mary 15 20852 US, depuis le 4 août 1983 et a reçu le numéro ATCC 39 405. La carte de restriction d'un clone (appelé M13-IL2) contenant l'insert de IL-2 est reproduite sur la figure 13. On prépare un ADN de phage mono-caténaire à partir du clone 20 M13-IL2 pour servir de copie pour la mutagenèse dirigée sur oligonucléotide.

Exemple 13

Mutagenèse dirigée sur oligonucléotide

Tel qu'indiqué précédemment, IL-2 contient des résidus 25 cystéine sur les positions des acides aminés 58, 105 et 125. A partir de ces séquences de nucléotides des portions du gène IL-2 qui contiennent les codons pour ces trois résidus cystéine, on construit trois oligonucléotides primaires et on les synthétise pour une mutation des codons pour ces 30 résidus en codons pour la sérine. Ces oligonucléotides ont les séquences suivantes:

CTTCTAGAGACTGCAGATGTTTC (DM27) pour changer cys 58,
 CATCAGCATACTCAGACATGAATG (DM 28) pour changer cys 105 et
 GATGATGCTCTGAGAAAAGGTAATC (DM 29) pour changer cys 125.

35 On traite séparément avec une kinase 40 picomoles de chaque oligonucléotide en présence de 0,1 mM d'ATP, 50 mM

7

de Tris-HCl, de pH 8,0, 10 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT et 9 unités de T₄ kinase dans 50 µl à 37°C pendant 1 heure. On hybride chacun des primaires traités avec une kinase (10 pmoles), avec 2,6 µg d'ADN M13-IL2 monocaténaire dans 15 µl d'un mélange contenant 100 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl de pH 7,9, 20 mM de MgCl₂ et 20 mM de β-mercaptoéthanol, en chauffant à 67°C pendant 5 minutes et à 42°C pendant 25 minutes. On refroidit les mélanges ainsi traités sur de la glace et on ajuste à un volume final de 25 µl d'un mélange de réaction contenant 0,5 mM de chaque dNTP, 17 mM de Tris-HCl de pH 7,9, 17 mM de MgCl₂, 83 mM de NaCl, 17 mM de β-mercaptoéthanol, 5 unités d'ADN polymérase I, fragment Klenow, 0,5 mM d'ATP et 2 unités de T₄ ADN ligase, on incube à 37°C pendant 5 heures. On termine les réactions en chauffant à 80°C et on utilise les mélanges réactionnels pour transformer des cellules de JM103 compétentes, on dépose sur des plaques de gélose et on incube pendant une nuit pour obtenir des plaques de phages.

Exemple 14

20 Sélection et identification des plaques de phages ayant subi une mutagénèse

On refroidit à 4°C des lames contenant des plaques de M13-IL2 ayant subi une mutagénèse ainsi que 2 lames contenant des plaques de phage M13-IL2 non-soumis à une mutagénèse et on transfère les plaques de phages de chaque lame sur deux filtres circulaires en nitrocellulose en déposant un filtre sec sur la plaque de gélose pendant 5 minutes pour le premier filtre et pendant 15 minutes pour le second filtre. On place alors les filtres sur des papiers filtres épais imprégnés dans NaOH 0,2 N, NaCl 1,5 M et 0,2 % de Triton pendant 5 minutes, puis on neutralise en déposant sur les filtres des papiers filtres imprégnés avec 0,5 M de Tris-HCl de pH 7,5 et 1,5 M de NaCl pendant 5 autres minutes. On lave deux fois les filtres d'une manière analogue sur des filtres imprégnés de SCC x 2, on sèche et on cuit dans une étuve à vide à 80°C pendant 2 heures. On pré-hybride les filtres en



double à 42°C pendant 4 heures avec 10 ml par filtre d'un tampon d'hybridation d'ADN (SSC x 5, pH de 7,0, solution de Denhardt x 4 (polyvinylpyrrolidone, ficoll et albumine sérique bovine, 1 fois = 0,02 % de chacune de ces substances)), 0,1 % de SDS, 50 mM d'un tampon de phosphate de sodium de pH 7,0 et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. On prépare des modèles marqués à ³²P en traitant par une kinase les primaires oligonucléotides avec ATP marqué. On hybride les filtres avec 0,1 x 10⁵ cpm/ml de primaires marqués à ³²P dans 5 ml par filtre d'un tampon d'hybridation d'ADN à 42°C pendant 8 heures. On lave deux fois les filtres à 50°C pendant 30 minutes chaque fois dans des tampons de lavage contenant 0,1 % de SDS et SSC x 2, et deux fois à 50°C pendant 30 minutes chaque fois avec 0,1 % de SDS et SSC x 2. On sèche les filtres à l'air et autoradiographie à -70°C pendant de 2 à 3 jours.

Etant donné qu'on a construit les oligonucléotides primaires DM28 et DM29 pour créer un nouveau site de restriction DdeI dans les clones ayant subi une mutagénèse (figure 14), on a fait digérer ADN-RF de plusieurs clones hybridés avec chacun des primaires traités par une kinase, avec l'enzyme de restriction DdeI. On recueille une des plaques M13-IL2 ayant subi une mutagénèse, hybridée avec le primaire DM28 et ayant un nouveau site de restriction DdeI (M13-LW44) et on inocule dans une culture de JM103, on prépare un ADN monocaténaire à partir du liquide surnageant dans la culture et on prépare un ADN-RF bicaténaire à partir du culot de cellules. De la même manière, on recueille une plaque hybridée avec le primaire DM29 (M-13-LW46) et à partir de cette plaque on prépare un ADN monocaténaire et un ADN-RF. Le primaire oligonucléotide DM27 a été conçu pour créer un nouveau site de restriction au lieu d'un site DdeI. En conséquence, on sélectionne les plaques hybridées avec ce primaire quant à la présence d'un nouveau site PstI. On identifie une telle plaque de phages (M13-LW42) et à partir de cette plaque on prépare un ADN monocaténaire et un ADN-RF. On analyse les

7

séquences d'ADN de ces trois clones pour confirmer que les codons cible TGT pour la cystéine ont bien été convertis en un codon TCT pour la sérine.

Exemple 15

5 Reclonage du gène Il-2 ayant subi une mutagenèse pour l'expression dans E.coli

On fait digérer séparément les ADN-RF de M13-LW42, M13-LW-44 et M13-LW46 avec des enzymes de restriction HindIII et BanII et on purifie les fragments d'inserts à partir d'un
10 gel d'agarose à 1 %. De la même manière, on fait digérer le plasmide pTrp3 (figure 7) avec HindIII et BanII, on purifie le grand fragment de plasmide contenant le promoteur trp sur un gel d'agarose et on le relie avec chacun des fragments d'inserts isolés à partir de M13-LW42, M13-LW44 et M13-LW46.
15 On transforme les plasmides liés dans une souche MM294 de E.coli K 12, compétente. On analyse les ADN plasmiques provenant de ces produits de transformation en établissant la carte des enzymes de restriction pour confirmer la présence des plasmides pLW42, pLW44 et pLW46. La figure 14
20 reproduit une carte de restriction de pLW46. Lorsque chacun des clones individuels est développé en l'absence de tryptophane pour induire le promoteur trp et qu'on analyse les extraits libres de cellules sur des gels de SDS-polyacrylamide, ces trois clones, pLW42, pLW44 et pLW46, s'avèrent
25 capables de synthétiser une protéine 14,5 kd semblable à celle trouvée dans le témoin positif, pLW21, qui s'est avéré capable de synthétiser une protéine 14,4 kd IL-2. Lorsque ces mêmes extraits sont examinés quant à leur activité en IL-2 sur des cellules HT-2 de souris, seuls les clones
30 pLW21 (témoin positif) et pLW46 montrent des quantités significatives d'activité IL-2 (Tableau II ci-dessous), indiquant que cys 58 et cys 105 sont nécessaires pour l'activité biologique et que leur changement en sérines (pLW42 et pLW46 respectivement) se traduit par une perte de l'activité biologique.
35 gique. Cys 125 d'autre part ne doit pas être nécessaire pour l'activité biologique car son changement en ser 125 (pLW46)

n'affecte pas l'activité biologique.

Tableau II

	<u>Clones</u>	<u>Activité IL-2 (u/ml)</u>
	pIL2-7 (témoin négatif)	1
5	pLW21 (témoin positif)	113 000
	pLW42	660
	pLW44	1 990
	pLW46	123 000

La figure 15a reproduit la séquence de nucléotides
 10 de la chaîne codante du clone pLW46. Par comparaison avec
 la chaîne codante du gène IL-2 humain natif, le clone pLW46
 montre un simple changement de base de G → C sur le nucléo-
 tide 374. La figure 15b reproduit la séquence d'acides aminés
 correspondante de la mutéine IL-2 codée par pLW46. Cette
 15 mutéine est désignée par IL-2_{ser125}. Par comparaison avec
 IL-2 natif, la mutéine a une sérine au lieu d'une cystéine
 en position 125.

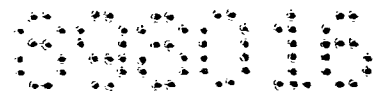
Un échantillon de la souche MM294 de E.coli K 12,
 transformé avec pLW46 est déposé dans l'American Type Cul-
 20 ture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland
 20852, US depuis le 26 septembre 1983 et a reçu le numéro
 ATCC 39 452.

Les mutéines de IL-2 dans lesquelles la cystéine en
 position 125 a été supprimée ou remplacée par un autre acide
 25 aminé, telles que la mutéine IL-2_{ser125}, conservent l'acti-
 vité IL-2. Elles peuvent donc être formulées et utilisées de
 la même manière que IL-2 natif. En conséquence, des mutéines
 IL-2 sont utilisables dans le diagnostic et le traitement
 30 zoaires et fongiques; dans des manifestations de lymphokine
 ou d'immuno-déficiencie; pour la reconstitution de fonctions
 immunes normales chez les êtres humains et les animaux agés;
 dans le développement de dosages diagnostiques tels que ceux
 utilisés dans l'amplification des enzymes, le radiomarquage,
 35 la radiovisualisation et d'autres procédés connus dans la
 technique de surveillance des taux de IL-2 chez un malade;



pour la promotion du développement des cellules T in vitro dans des buts thérapeutiques et de diagnostic pour le blocage des sites récepteurs pour les lymphokines; et dans diverses autres applications thérapeutiques, de diagnostic et de recherche. Les diverses applications thérapeutiques et de diagnostic de IL-2 humain ont été étudiées et rapportées par S.A. Rosenberg, E.A. Grimm et al, A. Mazumder et al, et E.A. Grimm et S.A. Rosenberg. Les mutéines de IL-2 peuvent être utilisées par elles-mêmes ou en association avec d'autres cellules B ou T immunologiquement applicables ou d'autres agents thérapeutiques. Pour des applications thérapeutiques ou de diagnostic, elles peuvent être formulées dans des milieux de véhicules non-toxiques, non-allergisants, physiologiquement acceptables, tels que l'eau distillée, une solution de Ringer, une solution de Hank, une solution saline physiologique et autres. Les administrations des mutéines IL-2 à des hommes ou à des animaux peuvent se faire par voie orale ou intrapéritonéale, intramusculaire ou souscutanée, selon l'avis du médecin. Comme exemples de cellules applicables, on citera les cellules B ou T, les cellules tueuses naturelles et autres, et comme réactifs thérapeutiques utilisables en association avec les polypeptides de l'invention, on citera à titre d'exemples les divers interférons, en particulier le gamma interféron, le facteur de croissance des cellules B, IL-1 et autres.





REVENDEICATIONS

1. Mutéine synthétique d'une protéine biologiquement active ayant au moins un reste cystéine capable de former une liaison disulfure et non-essentiel à l'activité biologique, caractérisée en ce que la mutéine a au moins un des restes: cystéine supprimé ou remplacé par un autre acide aminé.

2. Mutéine synthétique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il y a seulement un des restes cystéine.

3. Mutéine synthétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que les restes cystéine sont remplacés par la sérine, la thréonine, la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, l'histidine, la tyrosine, la phénylalanine, le tryptophane ou la méthionine.

4. Mutéine synthétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que les restes de cystéine sont remplacés par la sérine ou la thréonine.

5. Mutéine synthétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la mutéine n'est pas glycosylée.

6. Mutéine synthétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la protéine est IFN- β , IL-2, la lymphotoxine, le facteur 1 stimulant les colonies ou IFN- α 1.

7. Mutéine synthétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la protéine est IFN- β , le reste cystéine est en position 17 d'IFN- β , et le reste cystéine est remplacé par un reste sérine.

8. Mutéine synthétique selon la revendication 7, caractérisée en ce que la mutéine n'est pas glycosylée.

9. Mutéine synthétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la protéine est IL-2, le reste cystéine est en position 125 de IL-2, et le reste cystéine est remplacé par la sérine.

10. Mutéine synthétique selon la revendication 9, caractérisée en ce que la mutéine n'est pas glycosylée.

11. Gène structural caractérisé en ce que le gène a une séquence d'ADN qui code pour la mutéine synthétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

7

12. Vecteur d'expression caractérisé en ce que le vecteur comprend le gène structural de la revendication 11 en une position qui en permet l'expression.

5 13. Cellule ou organisme hôte, caractérisé en ce que la cellule ou l'organisme hôte est transformé avec le vecteur d'expression de la revendication 12, et sa descendance.

14. E.coli caractérisé en ce que E.coli est transformé avec le vecteur d'expression de la revendication 12, et sa descendance.

10 15. Procédé pour produire une mutéine synthétique, caractérisé en ce qu'on cultive l'hôte ou sa descendance selon la revendication 13 et on recueille la mutéine synthétique à partir de la culture.

15 16. Procédé pour empêcher une protéine ayant au moins un reste cystéine capable de former une liaison disulfure, de former la dite liaison, caractérisé en ce qu'on modifie la protéine par mutation en supprimant le reste cystéine ou en remplaçant le reste cystéine par un autre acide aminé.

20 17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la protéine est biologiquement active et la cystéine n'est pas essentielle à l'activité biologique.

18. Procédé selon l'une des revendications 16 et 17, caractérisé en ce que le reste cystéine est remplacé par la sérine ou la thréonine.

25 19. Procédé pour produire un gène selon la revendication 11, caractérisé en ce que:

30 (a) on hybride un ADN mono-caténaire comprenant une chaîne d'un gène structural qui code pour la protéine, avec un primaire oligonucléotide mutant qui est complémentaire de la région de la dite chaîne qui comprend le codon pour le reste cystéine ou le triplet "non-sens" apparié au codon, selon le cas, si ce n'est un mauvais assortiment avec le codon ou le triplet "non-sens" qui définit une suppression du codon ou un triplet qui code pour l'autre acide aminé;

35 (b) on prolonge le primaire avec l'ADN polymérase pour former un hétéroduplex de mutation; et



(c) on réplique l'hétéroduplex de mutation.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le mauvais assortiment définit un triplet qui code pour la sérine ou la thréonine.

5 21. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'ADN mono-caténaire est un phage mono-caténaire qui comprend la dite chaîne et l'hétéroduplex de mutation du stade (b) est converti en un hétéroduplex circulaire fermé.

10 22. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que la répllication est effectuée en transformant un hôte bactérien compétent avec l'hétéroduplex circulaire fermé et en cultivant les produits de transformation résultants.

15 23. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que les autres stades comprennent l'isolement de la descendance de la chaîne mutante de l'hétéroduplex, l'isolement de l'ADN de la dite descendance et l'isolement du gène à partir de l'ADN de la descendance.

20 24. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 23, caractérisé en ce que la protéine est l'IFN- β humain, le reste cystéine est en position 17 et le mauvais assortiment définit un codon pour la sérine.

25 25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que la chaîne est la chaîne "non-sens" d'IFN- β et le primaire oligonucléotide mutant est GCAATTTTCAGAGTCAG.

26. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 23, caractérisé en ce que la protéine est IL-2 humaine, le reste cystéine est en position 125 et le mauvais assortiment définit un codon qui code pour la sérine.

30 27. Oligonucléotide utilisable pour produire le gène structural selon la revendication 11 par une mutagénèse dirigée sur un oligonucléotide, caractérisé en ce que l'oligonucléotide a une séquence de nucléotides complémentaire de la région de la chaîne du gène structural qui comprend le
35 codon pour le reste cystéine ou le triplet "non-sens" apparié au dit codon, selon le cas, si ce n'est un mauvais assort-

7



10	20	30	40	50	60
ATGCCTACTT	CAAGTTCTAC	AAAGAAAACA	CAGCTACAAC	TGGAGCATT	ACTGCTGGAT
70	80	90	100	110	120
TTACAGATGA	TTTTGAATGG	AATTAATAAT	TACAAGAATC	CCAAACTCAC	CAGGATGCTC
130	140	150	160	170	180
ACATTTAAGT	TTTACATGCC	CAAGAAGGCC	ACAGAACTGA	AACATCTTCA	GTGTCTAGAA
190	200	210	220	230	240
GAAGAACTCA	AACCTCTGGA	GGAAGTGCTA	AATTTAGCTC	AAAGCAAAAA	CTTTCACCTTA
250	260	270	280	290	300
AGACCCAGGG	ACTTAATCAG	CAATATCAAC	GTAATAGTTC	TGGAACTAAA	GGGATCTGAA
310	320	330	340	350	360
ACAACATTCA	TGTGTGAATA	TGCTGATGAG	ACAGCAACCA	TTGTAGAATT	TCTGAACAGA
370	380	390	400	410	420
TGGATTACCT	TTTCTCAGAG	CATCATCTCA	ACACTGACTT	GA	

FIG. 15a

5	10	15	20
MetProThrSerSer	SerThrLysLysThr	GlnLeuGlnLeuGlu	HisLeuLeuLeuAsp
25	30	35	40
LeuGlnMetIleLeu	AsnGlyIleAsnAsn	TyrLysAsnProLys	LeuThrArgMetLeu
45	50	55	60
ThrPheLysPheTyr	MetProLysLysAla	ThrGluLeuLysHis	LeuGlnCysLeuGlu
65	70	75	80
GluGluLeuLysPro	LeuGluGluValLeu	AsnLeuAlaGlnSer	LysAsnPheHisLeu
85	90	95	100
ArgProArgAspLeu	IleSerAsnIleAsn	ValIleValLeuGlu	LeuLysGlySerGlu
105	110	115	120
ThrThrPheMetCys	GluTyrAlaAspGlu	ThrAlaThrIleVal	GluPheLeuAsnArg
125	130	135	140
TrpIleThrPheSer	GlnSerIleIleSer	ThrLeuThr---	

FIG. 15b

Bruxelles, le 18 octobre 1983
 P.Pon. de CETUS CORPORATION
 OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER

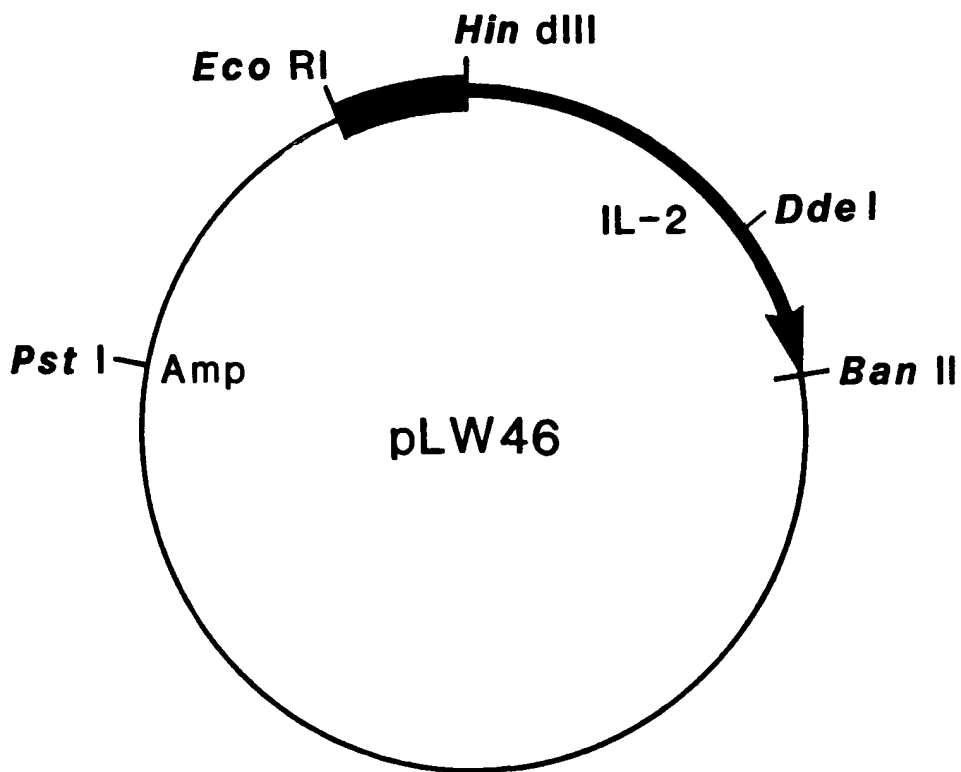


FIG. 14

Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER

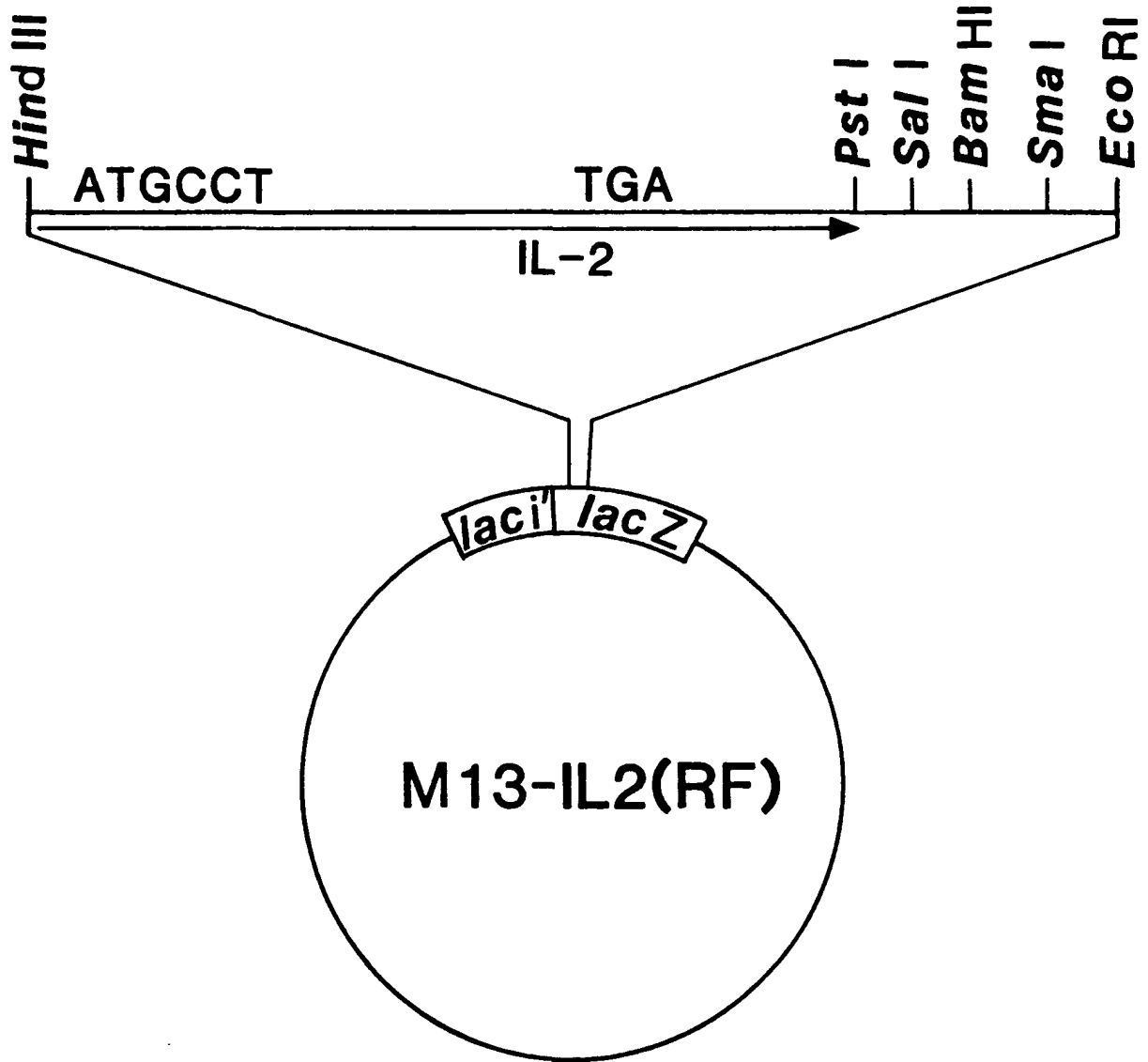


FIG. 13

Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER

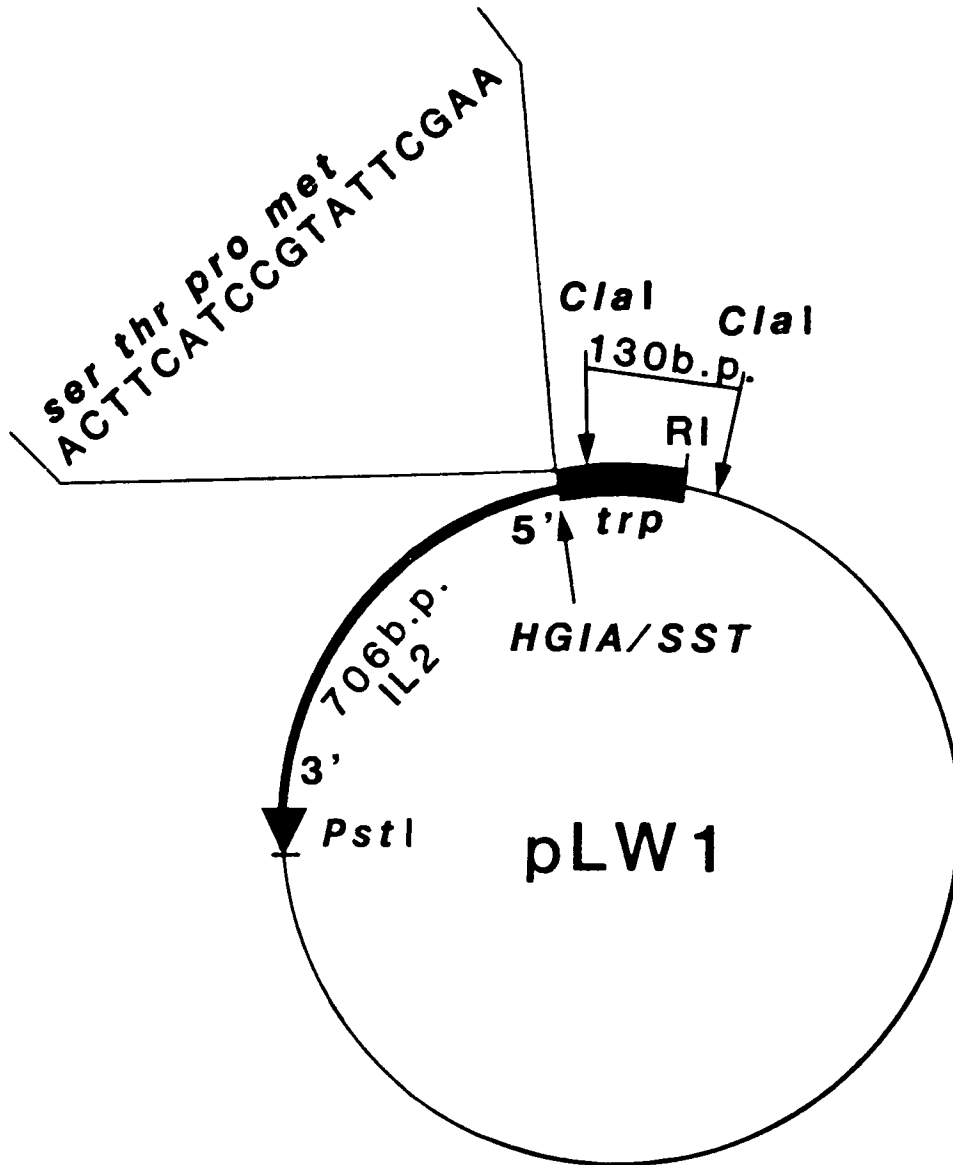
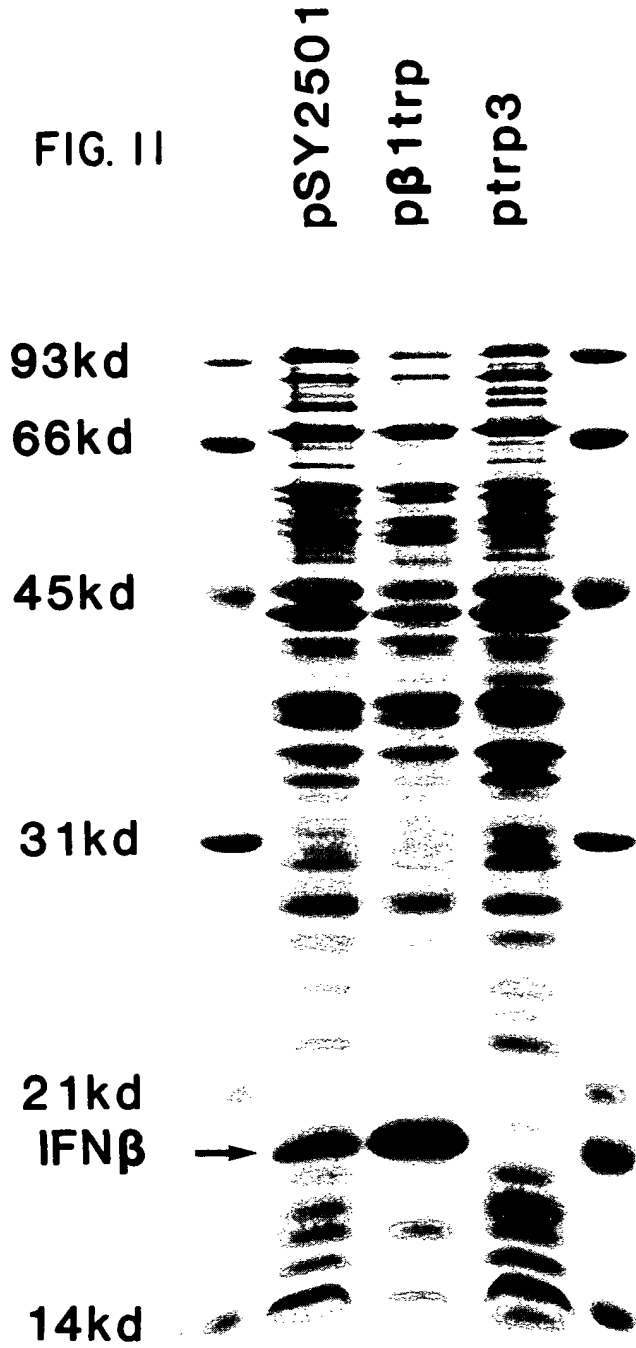
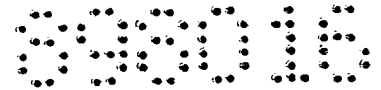


FIG. 12

Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER



Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER



IFN-B Changement CYS en SER sur l'acide anime 17

1
 ATG AGC TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT CAG ¹⁷AGT CAG AAG CTC
 met ser tyr asn leu leu gly phe leu gln arg ser ser asn phe gln ser gln lys leu

61
 CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG CTT GAA TAT TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC
 leu trp gln leu asn gly arg leu glu tyr cys leu lys asp arg met asn phe asp ile

121
 CCT GAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC TAT
 pro glu glu ile lys gln leu gln gln phe gln lys glu asp ala ala leu thr ile tyr

181
 GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT AGC ACT GGC TGG AAT
 glu met leu gln asn ile phe ala ile phe arg gln asp ser ser ser thr gly trp asn

241
 GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA
 glu thr ile val glu asn leu leu ala asn val tyr his gln ile asn his leu lys thr

301
 GTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG
 val leu glu glu lys leu glu lys glu asp phe thr arg gly lys leu met ser ser leu

361
 CAC CTG AAA AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT CAC
 his leu lys arg tyr tyr gly arg ile leu his tyr leu lys ala lys glu tyr ser his

421
 TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC TTC ATT AAC AGA CTT
 cys ala trp thr ile val arg val glu ile leu arg asn phe tyr phe ile asn arg leu

481
 ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGA AGA TC
 thr gly tyr leu arg asn ***

FIG. 10

Bruxelles, le 18 octobre 1983
 P.Pon. de CETUS CORPORATION
 OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER

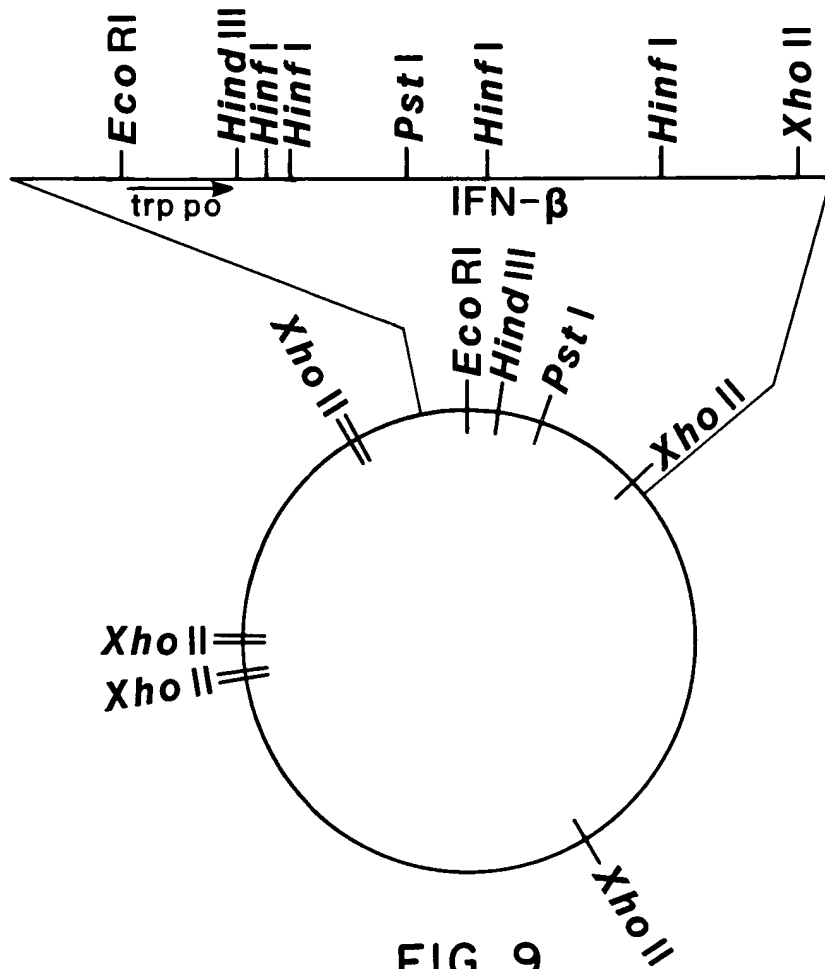


FIG. 9

Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER

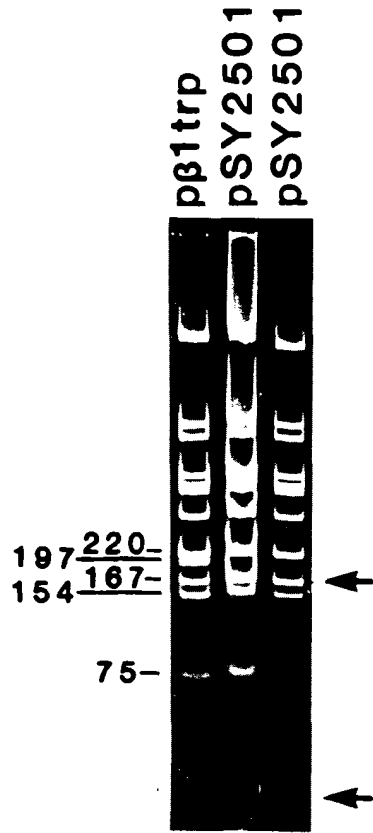


FIG. 8a

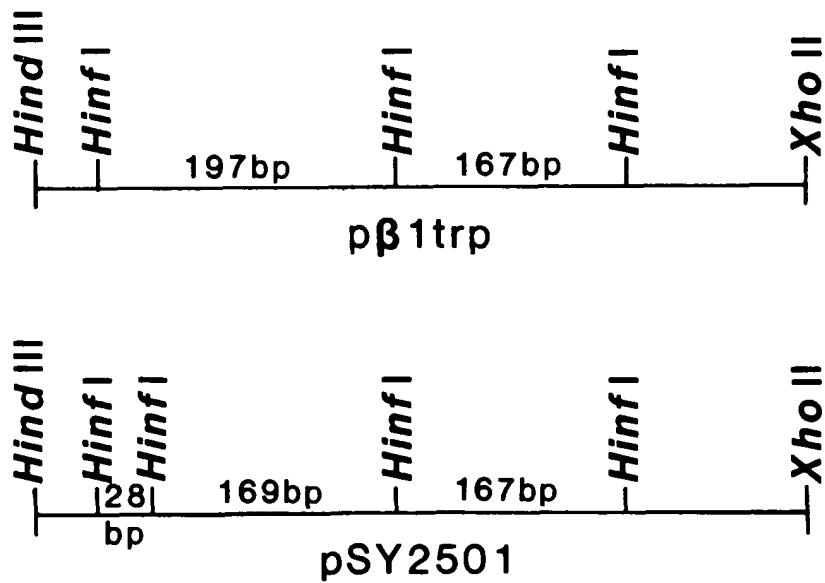
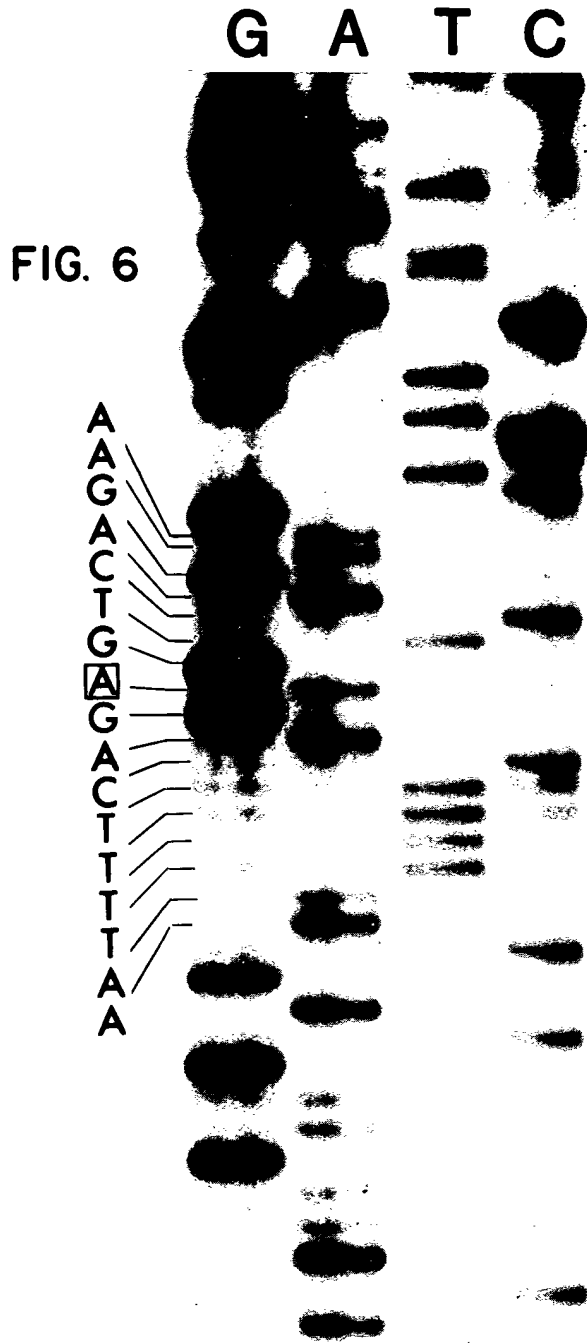


FIG. 8b

Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER



Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK G.C. PLUCKER

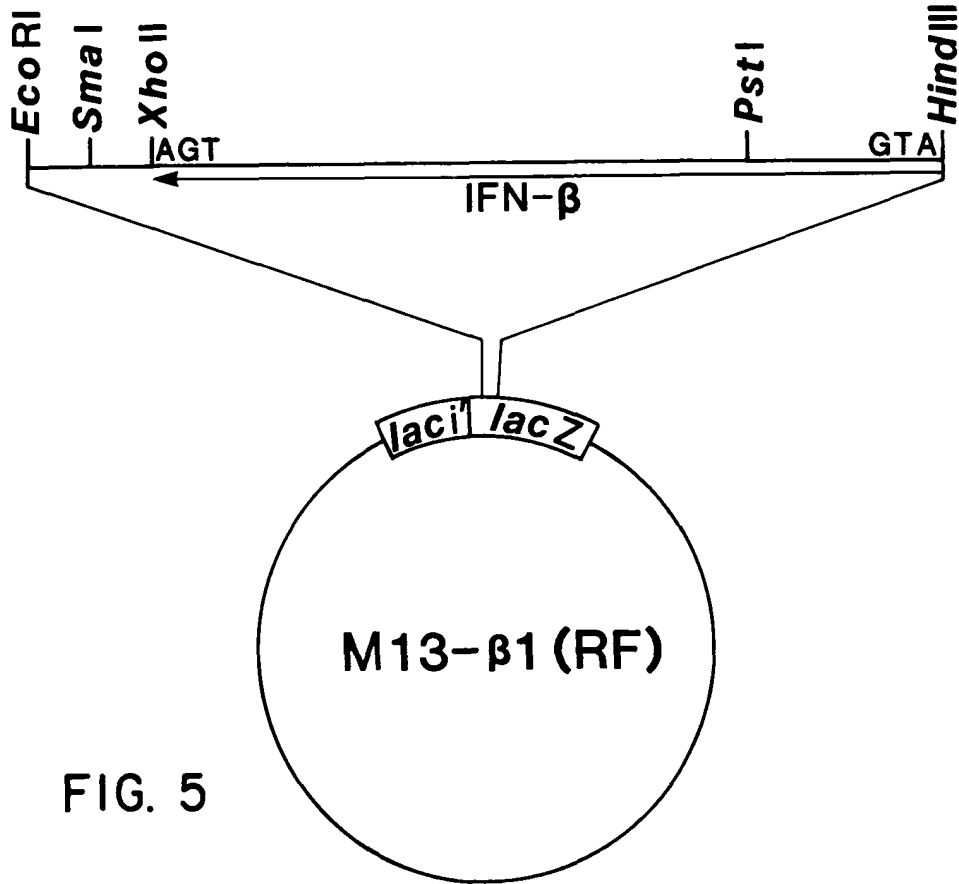


FIG. 5

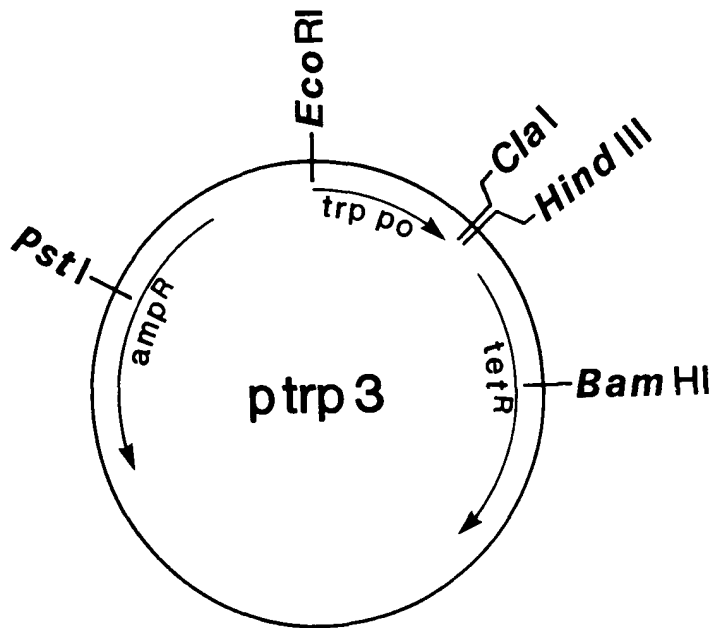


FIG. 7

Bruxelles, le 18 octobre 1983

P.Pon. de CETUS CORPORATION

OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER

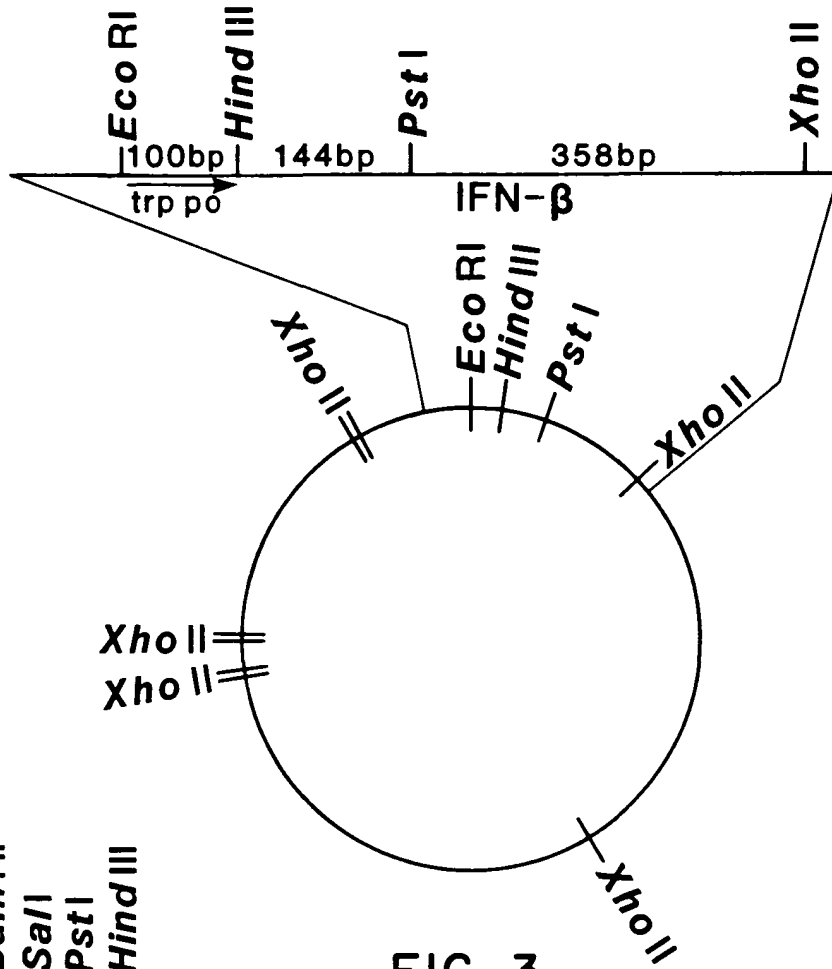


FIG. 3

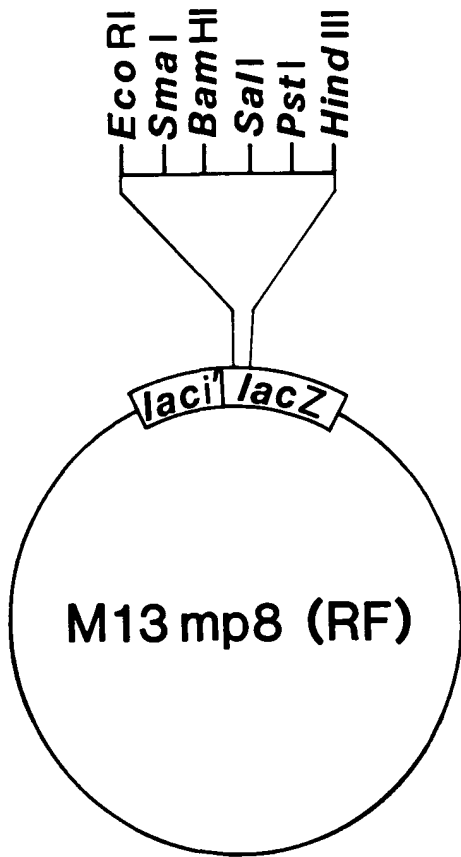


FIG. 4

Bruxelles, le 18 octobre 1983
P.Pon. de CETUS CORPORATION
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER

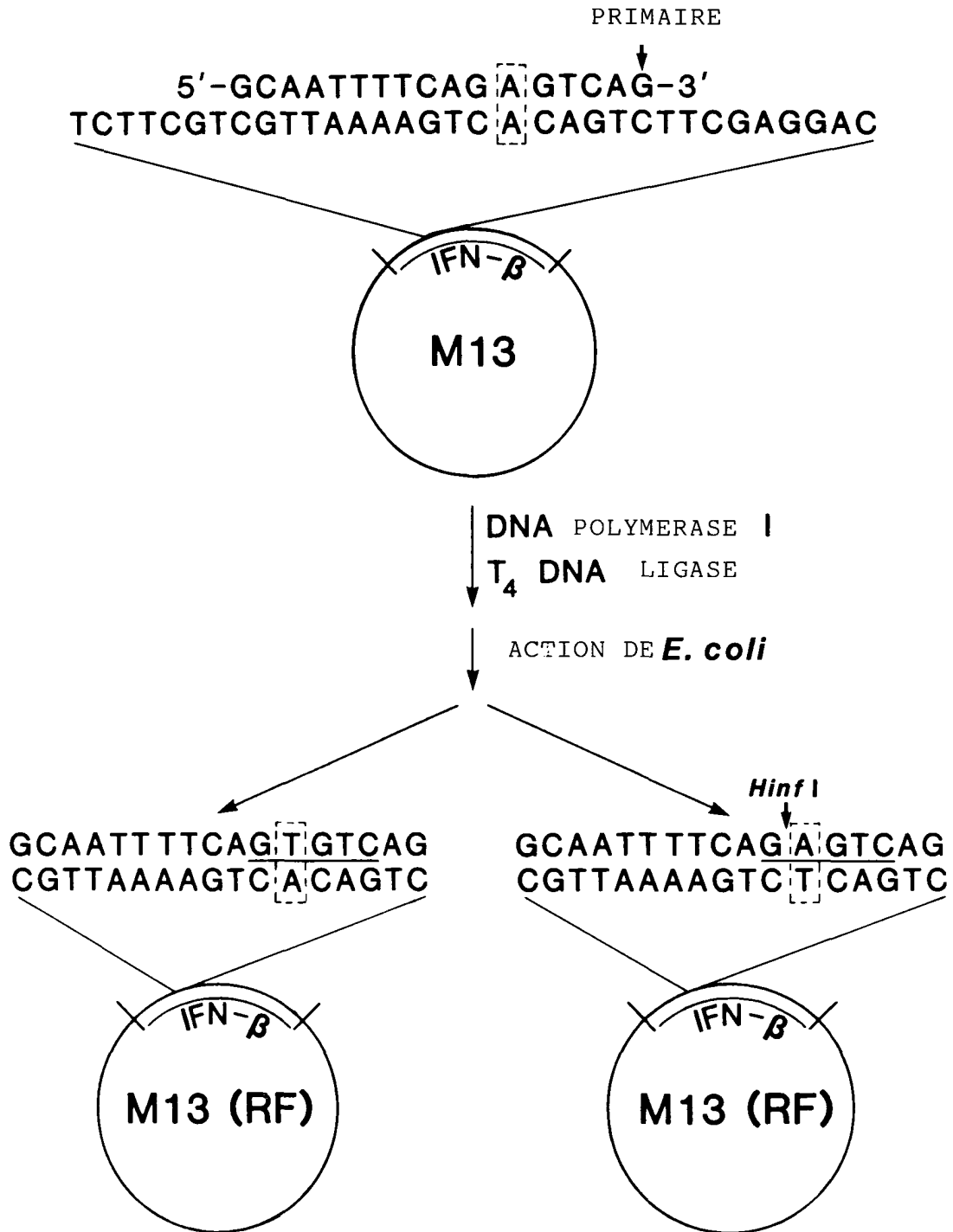
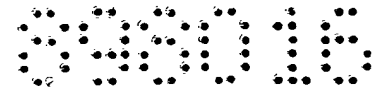


FIG. 2



5	10	15	20
MetSerTyrAsnLeu	LeuGlyPheLeuGln	ArgSerSerAsnPhe	GlnCysGlnLysLeu
25	30	35	40
LeuTrpGlnLeuAsn	GlyArgLeuGluTyr	CysLeuLysAspArg	MetAsnPheAspIle
45	50	55	60
ProGluGluIleLys	GlnLeuGlnGlnPhe	GlnLysGluAspAla	AlaLeuThrIleTyr
65	70	75	80
GluMetLeuGlnAsn	IlePheAlaIlePhe	ArgGlnAspSerSer	SerThrGlyTrpAsn
85	90	95	100
GluThrIleValGlu	AsnLeuLeuAlaAsn	ValTyrHisGlnIle	AsnHisLeuLysThr
105	110	115	120
ValLeuGluGluLys	LeuGluLysGluAsp	PheThrArgGlyLys	LeuMetSerSerLeu
125	130	135	140
HisLeuLysArgTyr	TyrGlyArgIleLeu	HisTyrLeuLysAla	LysGluTyrSerHis
145	150	155	160
CysAlaTrpThrIle	ValArgValGluIle	LeuAgAsnPheTyr	PheIleAsnArgLeu
165	170	175	180
ThrGlyTyrLeuArg	Asn---		

FIG. 1

Bruxelles, le 18 octobre 1983
 P.Pon. de CETUS CORPORATION
 OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER