

ROYAUME DE BELGIQUE

BF



BE 1008267A

NUMERO DE PUBLICATION : 1008267A3

NUMERO DE DEPOT : 09400102

Classif. Internat. : C12N

Date de délivrance le : 05 Mars 1996



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

**Le Ministre des Affaires Economiques,**

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 28 Janvier 1994 à 24H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SOLVAY (Société Anonyme)  
rue du Prince Albert 33, B-1050 BRUXELLES(BELGIQUE)

représenté(e)s par : MEYERS Liliane, SOLVAY - Département Prop. Indus., Rue de Ransbeek, 310 - 1120 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour ; SYSTEME D'EXPRESSION, VECTEUR D'INTEGRATION ET CELLULE TRANSFORMEE PAR CE VECTEUR D'INTEGRATION.

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 05 Mars 1996  
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L  
Directeur.

Système d'expression, vecteur d'intégration et cellule transformée par ce vecteur d'intégration

L'invention concerne un système d'expression utilisable pour la production de glucose oxydase et, plus particulièrement, capable d'effectuer la production extracellulaire de la glucose oxydase.

5 L'invention concerne également un vecteur d'intégration contenant ce système d'expression et une cellule transformée par ce vecteur d'intégration.

10 La glucose oxydase est classée dans le système international selon la référence E.C. 1.1.3.4. ou  $\beta$ -D-glucose:oxygène-1-oxydoréductase. Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en D-glucono- $\delta$ -lactone qui est ensuite hydrolysé en acide gluconique. Cette réaction produit du peroxyde d'hydrogène, qui est transformé en oxygène et en eau par l'action de la catalase produite par les souches sauvages d'*Aspergillus niger*.

15 La glucose oxydase est naturellement produite par certaines souches de champignons filamenteux et notamment par des souches d'*Aspergillus*. Malheureusement, la glucose oxydase produite par ces souches d'*Aspergillus* n'est pas sécrétée de manière efficace dans le milieu de culture de ces souches, la glucose oxydase ne traversant pas la paroi cellulaire (WITTEVEEN C.F.B. et al.,  
20 Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58 (4), pages 1190-1194). Industriellement la glucose oxydase est donc traitée comme une enzyme intracellulaire. Les cellules d'*Aspergillus* doivent être disloquées préalablement à la récupération et à la  
25 purification de la glucose oxydase. L'étape supplémentaire de dislocation des cellules, avant la récolte, est contraignante et difficile à réaliser industriellement, par ailleurs elle entraîne des chutes de rendement assez importantes. En effet, après la dislocation des cellules, la suspension aqueuse obtenue contient  
30 la glucose oxydase en solution ainsi que d'autres enzymes et des

polypeptides, mais également beaucoup de constituants cellulaires plus ou moins solubles. Une étape de purification comportant plusieurs opérations de séparation est donc indispensable pour obtenir la glucose oxydase pure ou industriellement utilisable.

5 C'est pourquoi une production extracellulaire de la glucose oxydase, c'est à dire la sécrétion de l'enzyme dans le milieu de culture, a longtemps été recherchée.

Par ailleurs, une méthode de production de glucose oxydase dans laquelle de la catalase ne serait présente qu'en quantités  
10 minimales dans le milieu, a longtemps été recherchée. Ceci a pour but d'éviter que le peroxyde d'hydrogène, formé lors de la réaction catalysée par la glucose oxydase, ne soit dégradé en oxygène et en eau par la catalase présente dans le milieu.

Dans ce contexte, on propose dans la demande de brevet WO  
15 89/12675 de transformer une levure avec un plasmide. Ce plasmide contient la séquence du promoteur d'une déhydrogénase (ADH2-GAP) de levure, la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* ou la séquence du signal de sécrétion de l'" $\alpha$ -mating factor" de *Saccharomyces cerevisiae*, la séquence  
20 mature de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* et le terminateur d'une déhydrogénase (GAP) de levure. La levure transformée (*Saccharomyces cerevisiae*) sécrète la glucose oxydase.

Dans la demande de brevet européen 0 357 127, on décrit un  
25 système d'expression utilisable pour la production de chymosine bovine. Ce système d'expression comprend la séquence du promoteur de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*, la séquence du peptide signal de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*, la séquence codante de la chymosine bovine et la séquence du termi-  
30 nateur de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*. Une souche transformée d'*Aspergillus niger*, contenant ce système d'expression, permet d'obtenir la chymosine bovine.

A l'heure actuelle, un système d'expression permettant  
d'obtenir l'expression et une sécrétion efficace de la glucose  
35 oxydase par une souche transformée de champignon filamenteux contenant ce système d'expression, n'est pas connu.

La présente invention a pour premier but de fournir un système d'expression permettant d'obtenir la glucose oxydase dans le milieu de culture, où la souche transformée contenant ce système d'expression est cultivée. Ce système d'expression  
5 permet d'obtenir une production substantiellement extracellulaire de la glucose oxydase. Ce système d'expression permet de plus d'obtenir une composition enzymatique contenant la glucose oxydase pratiquement sans catalase.

Par glucose oxydase, on entend une enzyme qui catalyse la  
10 réaction d'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en D-glucono- $\delta$ -lactone qui est ensuite hydrolysé en acide gluconique. Cette enzyme est classée dans le système international selon la référence E.C. 1.1.3.4. ou  $\beta$ -D-glucose:oxygène-1-oxydoréductase. Cette définition inclut les enzymes naturelles et les enzymes modi-  
15 fiées, telles que les enzymes dont la séquence de nucléotides ou d'acides aminés a été modifiée par des techniques de génie gé-  
nétique.

La présente invention a également pour but de fournir un vecteur d'intégration et un plasmide contenant le système  
20 d'expression décrit ci-dessus.

La présente invention a également pour but de fournir une souche transformée d'Aspergillus, et plus particulièrement une souche transformée d'Aspergillus foetidus, qui exprime et sécrète dans son milieu de culture la glucose oxydase avec un haut niveau  
25 de productivité. La sécrétion de la glucose oxydase par cette souche transformée est substantiellement extracellulaire.

La présente invention a également pour but de fournir un procédé de production de glucose oxydase mettant en oeuvre une souche de champignon filamenteux qui produit beaucoup de glucose  
30 oxydase et la sécrète presque complètement de façon extracellulaire.

A cet effet, l'invention concerne un système d'expression utilisable pour la production extracellulaire de glucose oxydase, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- 35
- la séquence du promoteur de la glucoamylase,
  - la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase,

- la séquence mature de la glucose oxydase, et
- la séquence du terminateur de la glucoamylase.

L'invention concerne un système d'expression utilisable pour la production de glucose oxydase, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- 5 - la séquence du promoteur de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus*,
- la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase d'*Aspergillus foetidus*,
- 10 - la séquence mature de la glucose oxydase d'*Aspergillus foetidus*, et
- la séquence du terminateur de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus*.

Par système d'expression, on entend une unité moléculaire intégrée dans le génome d'un champignon filamenteux et capable de fournir à ce champignon l'information génétique nécessaire à la biosynthèse de la glucose oxydase.

Par promoteur de la glucoamylase, on entend le ou les promoteur(s) de transcription. Le promoteur qui est constitué d'une séquence d'ADN montrant une forte activité de transcription, peut être précédé par des séquences d'ADN qui stimulent la transcription, telles que des séquences connues sous le nom de "enhancers" ou "Upstream Activating Sequences". Le promoteur contient des séquences de contrôle de transcription qui influent sur l'expression de l'ADN codant fusionné. La séquence du promoteur de la glucoamylase comprend les séquences qui contrôlent la transcription et qui interviennent lors de l'expression de la glucoamylase.

Habituellement, la séquence du promoteur de la glucoamylase provient d'un champignon filamenteux. Généralement, elle provient d'une souche d'*Aspergillus*. De préférence, elle provient d'une souche appartenant au groupe *Aspergillus niger*, telle que notamment une souche d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus foetidus*, d'*Aspergillus awamori* ou d'*Aspergillus ficuum*. De manière particulièrement préférée, elle provient d'une souche d'*Aspergillus niger* ou d'une souche d'*Aspergillus foetidus*. De

préférence, la séquence du promoteur de la glucoamylase provient d'une souche d'*Aspergillus foetidus*. De manière particulièrement préférée, elle provient de la souche d'*Aspergillus foetidus* SE4.

5 Par la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase, on entend une séquence d'ADN correspondant à une séquence d'acides aminés qui est naturellement liée de façon opérationnelle à la terminaison aminée de la séquence mature de la glucose oxydase. Le gène codant pour la glucose oxydase a été cloné et séquencé, la séquence en acides aminés qui a été déduite de cette  
10 étude montre la présence d'une préséquence ayant certaines caractéristiques d'un peptide signal, mais plus complexes (WHITTINGTON H. et al., Curr. Genet., 18 (1990), pages 531-536). C'est pourquoi, dans cette demande, la partie du gène de structure, qui code pour le peptide signal supposé, est nommé "séquence du  
15 signal de sécrétion de la glucose oxydase" et la partie de gène de structure, qui code pour la glucose oxydase en tant que telle, est nommé "séquence mature de la glucose oxydase".

Habituellement, la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase provient d'une souche de champignon filamenteux.  
20 Généralement, elle provient d'une souche d'*Aspergillus* ou d'une souche de *Penicillium*. De préférence, elle provient d'une souche appartenant au groupe *Aspergillus niger*, telle que notamment une souche d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus foetidus*, d'*Aspergillus awamori* ou d'*Aspergillus ficuum*. De manière particulièrement  
25 préférée, elle provient d'une souche d'*Aspergillus niger* ou d'une souche d'*Aspergillus foetidus*. De bons résultats ont été obtenus avec la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase de la souche d'*Aspergillus niger* NRRL 3 (AGRICULTURAL RESEARCH  
30 SERVICE CULTURE COLLECTION (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA). Cette séquence a été publiée dans The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265 (7), pages 3793-3802. De bons résultats ont également été obtenus avec la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase de la  
35 souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776, USA).

Le système d'expression selon l'invention comprend la séquence mature de la glucose oxydase. Par séquence mature de la glucose oxydase, on entend la partie de la séquence qui est traduite en protéine active, c'est à dire la séquence codante de la glucose oxydase qui correspond au gène de structure de la glucose oxydase sans la séquence du signal de sécrétion.

Habituellement, la séquence mature de la glucose oxydase provient d'une souche de champignon filamenteux. Généralement, elle provient d'une souche d'*Aspergillus* ou d'une souche de *Penicillium*. De préférence, elle provient d'une souche appartenant au groupe *Aspergillus niger*, telle que notamment une souche d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus foetidus*, d'*Aspergillus awamori* ou d'*Aspergillus ficuum*. De manière particulièrement préférée, elle provient d'une souche d'*Aspergillus niger* ou d'une souche d'*Aspergillus foetidus*. De bons résultats ont été obtenus avec la séquence mature de la glucose oxydase de la souche d'*Aspergillus niger* NRRL 3. Cette séquence a été publiée dans *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265 (7), pages 3793-3802. De bons résultats ont également été obtenus avec la séquence mature de la glucose oxydase de la souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION).

Dans une variante préférée de l'invention, la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase et la séquence mature de la glucose oxydase proviennent du même champignon filamenteux. D'excellents résultats ont été obtenus avec un système d'expression, selon l'invention, comprenant la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase de la souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916 et la séquence mature de la glucose oxydase de la souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916. D'excellents résultats ont également été obtenus avec un système d'expression, selon l'invention, comprenant la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase de la souche d'*Aspergillus niger* NRRL 3 et la séquence mature de la glucose oxydase de la souche d'*Aspergillus niger* NRRL 3.

Par terminateur, on entend le ou les terminateur(s) de transcription. La séquence du terminateur de la glucoamylase est

une séquence d'ADN qui agit pour terminer la transcription de la glucoamylase. La séquence du terminateur contient également des séquences de polyadénylation qui stabilisent le mARN.

Habituellement, la séquence du terminateur de la glucoamylase provient d'un champignon filamenteux. Généralement, elle provient d'une souche d'*Aspergillus*. De préférence, elle provient d'une souche appartenant au groupe *Aspergillus niger*, telle que notamment une souche d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus foetidus*, d'*Aspergillus awamori* ou d'*Aspergillus ficuum*. De manière particulièrement préférée, elle provient d'une souche d'*Aspergillus niger* ou d'une souche d'*Aspergillus foetidus*. De préférence, la séquence du terminateur de la glucoamylase provient d'une souche d'*Aspergillus foetidus*. De manière particulièrement préférée, elle provient de la souche d'*Aspergillus foetidus* SE4.

Dans une variante préférée de l'invention, la séquence du promoteur de la glucoamylase et la séquence du terminateur de la glucoamylase proviennent du même champignon filamenteux. De bons résultats ont été obtenus avec un système d'expression, selon l'invention, comprenant la séquence du promoteur de la glucoamylase de la souche d'*Aspergillus foetidus* et la séquence du terminateur de la souche d'*Aspergillus foetidus*. D'excellents résultats ont été obtenus avec un système d'expression, selon l'invention, comprenant la séquence du promoteur de la glucoamylase de la souche d'*Aspergillus foetidus* SE4 et la séquence du terminateur de la souche d'*Aspergillus foetidus* SE4.

Dans le système d'expression selon l'invention, la séquence du promoteur est positionnée en amont de la séquence du signal de sécrétion, qui elle-même est positionnée en amont de la séquence mature, cette séquence mature est positionnée en amont de la séquence du terminateur. Ces positionnements sont choisis de telle sorte que, dans des conditions appropriées, ils permettent l'expression de la glucose oxydase sous le contrôle des signaux de transcription, c'est à dire du promoteur et du terminateur.

Les séquences comprises dans le système d'expression sont liées de façon opérationnelle. La séquence du promoteur de

glucoamylase est liée de façon opérationnelle à la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase. La séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase est liée de façon opérationnelle à la séquence mature de la glucose oxydase. La séquence  
5 mature de la glucose oxydase est liée de façon opérationnelle à la séquence du terminateur de la glucoamylase.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un système d'expression comprenant au moins la séquence du promoteur de la glucoamylase, la séquence du signal de sécrétion  
10 de la glucose oxydase, la séquence mature de la glucose oxydase, et la séquence du terminateur de la glucoamylase. Ce procédé comprend

- l'isolement de la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase et de la séquence mature de la glucose oxydase à partir  
15 de l'ADN génomique d'un microorganisme qui produit cette glucose oxydase, et
- l'introduction de la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase et de la séquence mature de la glucose oxydase sur un vecteur contenant la séquence du promoteur de la gluco-  
20 amyrase et la séquence du terminateur de la glucoamylase, cette introduction étant faite dans un site choisi de telle sorte que le positionnement des séquences permettent l'expression de la glucose oxydase sous le contrôle dudit promoteur et dudit  
terminateur.

25 L'invention concerne également un vecteur d'intégration contenant le système d'expression tel que défini ci-dessus, et apte à permettre l'expression de la glucose oxydase.

Le principe de l'invention s'applique également à un vecteur d'expression contenant le système d'expression tel que défini  
30 ci-dessus, et apte à permettre l'expression de la glucose oxydase.

Par vecteur d'intégration, on entend toute séquence d'ADN qui comprend un réplicon et d'autres régions d'ADN (séquences de nucléotides) et qui est fonctionnelle indépendamment de l'hôte  
35 comme une unité d'expression génique complète. Par unité d'expression génique complète, on entend le gène de structure et

la (ou les) région(s) du promoteur et la (ou les) région(s) de  
régulation nécessaire pour la transcription et la traduction.  
Par gène de structure, on entend la séquence codante qui est uti-  
lisée pour la transcription en ARN et permet la synthèse de la  
5 protéine par l'hôte.

De préférence, ce vecteur d'intégration est un plasmide. De  
bons résultats ont été obtenus avec le plasmide pFGOD.

L'invention concerne également une cellule transformée par  
le vecteur d'intégration défini ci-dessus. Cette cellule  
10 transformée est choisie de telle sorte que la séquence du  
promoteur de la glucoamylase et la séquence du terminateur de la  
glucoamylase comprises dans le système d'expression soient  
reconnue par cette cellule transformée, c'est à dire qu'elles  
sont compatibles et fonctionnelles pour cette cellule  
15 transformée, la séquence du promoteur de la glucoamylase et la  
séquence du terminateur de la glucoamylase comprises dans le  
système d'expression remplissent leur fonctions respectives de  
signal de transcription, comme respectivement un promoteur et un  
terminateur, pour la cellule transformée.

20 Habituellement, la cellule transformée est une cellule de  
champignon filamenteux. Généralement, la cellule transformée est  
une cellule d'*Aspergillus*. De préférence, la cellule transformée  
est une cellule appartenant au groupe des souches d'*Aspergillus*  
*niger*. De manière particulièrement préférée, la cellule  
25 transformée est une cellule d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus*  
*foetidus*, d'*Aspergillus awamori* ou d'*Aspergillus ficuum*. De bons  
résultats ont été obtenus avec une cellule transformée d'*Asper-*  
*gillus niger*, et plus particulièrement avec une cellule  
transformée de la souche d'*Aspergillus niger* NRRL 3.  
30 D'excellents résultats ont été obtenus avec une cellule  
transformée d'*Aspergillus foetidus*, et plus particulièrement avec  
une cellule transformée de la souche d'*Aspergillus foetidus* SE4.

Dans une variante préférée de l'invention, la cellule  
transformée par le vecteur d'intégration correspond à une cellule  
35 transformée de la souche d'où provient la séquence du promoteur  
de la glucoamylase ou la séquence du terminateur de la

glucoamylase, séquence comprise dans le système d'expression. D'excellents résultats ont été obtenus avec une cellule transformée d'*Aspergillus foetidus* SE4. Cette cellule transformée par un vecteur d'intégration contient un système  
5 d'expression selon l'invention, ce système d'expression comprenant la séquence du promoteur de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus* SE4 et la séquence du terminateur de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus* SE4. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une cellule transformée par le plasmide pFGOD.

10 Par champignon filamenteux, on entend les microorganismes eucaryotes qui comprennent toutes les formes filamenteuses de la division Eumycota. Dans cette division sont inclus les groupes Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et les champignons imparfaits incluant les Hyphomycètes. Les genres suivants sont  
15 compris dans cette définition : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochiobolus*, *Pyricularia*, *Penicillium*, *Humicola*.

L'invention concerne également la souche purifiée et isolée d'*Aspergillus foetidus* SE4tr. Cette souche transformée SE4tr est  
20 obtenue à partir de la souche SE4. Elle diffère de cette souche SE4 par le fait qu'elle contient une ou plusieurs copies du plasmide pFGOD intégré dans son génôme.

La souche d'*Aspergillus foetidus* SE4 a été obtenue à partir de la souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916 par mutagenèse et  
25 sélectionnée sur la base d'une production améliorée en glucoamylase.

L'invention concerne également un procédé pour la production extracellulaire de glucose oxydase caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 30 - transformation d'une cellule par un vecteur d'intégration contenant un système d'expression tel que défini ci-dessus dans des conditions permettant l'expression et la sécrétion de la glucose oxydase,  
- culture de la cellule transformée dans un milieu de culture  
35 adéquat, et  
- récupération de la glucose oxydase sécrétée.

Le milieu de fermentation obtenu après la culture de la cellule transformée contient la majeure partie de la glucose oxydase. En effet, la glucose oxydase est substantiellement sécrétée dans le milieu de culture par la souche transformée. La  
5 glucose oxydase obtenue par le procédé de l'invention est essentiellement extracellulaire.

Le milieu de fermentation obtenu après la culture de la cellule transformée ne contient pratiquement pas de catalase. Ceci permet d'obtenir une composition enzymatique contenant la  
10 glucose oxydase substantiellement sans catalase.

La glucose oxydase a de nombreuses applications industrielles, telles que, par exemple, dans les industries alimentaires, les industries pharmaceutiques et les industries chimiques.

15 Elle est notamment employée pour mesurer le taux de glucose dans le sang et peut, pour cette application, être incorporée dans un kit de diagnostic. La glucose oxydase obtenue selon l'invention présente un avantage dans cette application puisqu'elle n'est pas contaminée par de la catalase.

20 La glucose oxydase peut être utilisée pour mesurer la concentration de glucose et d'oxygène.

La glucose oxydase peut être utilisée comme anti-oxydant, pour enlever l'oxygène ou le glucose, notamment dans certains produits alimentaires ou certaines boissons.

25 La glucose oxydase peut également être introduite dans les dentifrices pour la prévention des caries.

La glucose oxydase a été incorporée à certaines peintures pour prévenir la corrosion.

30 La figure 1 représente la carte de restriction du plasmide pUCGOD.

La figure 2 représente la carte de restriction du plasmide pFGA1.

La figure 3 représente la carte de restriction du plasmide pFGA2.

35 La figure 4 représente la carte de restriction du plasmide pFGA2MUT.

La figure 5 représente la carte de restriction du plasmide pFGOD.

Les symboles et abréviations utilisés dans ces figures sont explicités dans le tableau 1.

5

TABLEAU 1

Symbole Abréviation	Signification
AMPR	Gène apportant la résistance à l'ampicilline
ORI	Origine de répllication dans E. coli
GOD	Séquence codante de la glucose oxydase d' <i>Aspergillus foetidus</i> ATCC 14916
5' GA	Promoteur de la glucoamylase d' <i>Aspergillus foetidus</i> SE4
3' GA	Termineur de la glucoamylase d' <i>Aspergillus foetidus</i> SE4
GA	Séquence codante de la glucoamylase d' <i>Aspergillus foetidus</i> SE4

La présente invention est illustrée par les exemples suivants.

Exemple 1

10 Isolement de la séquence codante de la glucose oxydase d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916

On réalise une culture de la souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916 sur un milieu nutritif liquide ACM ("*Aspergillus Complete Medium*") qui contient 2 % (poids/volume) d'extrait de malt, 0,1 % (poids/volume) de peptone (DIFCO) et 2 %  
15 (poids/volume) de glucose. Après une incubation de 48 heures à 32 °C, le mycélium est récolté.

La séquence codante (gène de structure) comprend la séquence du signal de sécrétion et la séquence mature de la glucose oxydase.

20 L'ADN génomique de la souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916 est isolé selon la technique décrite dans GARBBER, R.C. and

YODER, O.L., Anal. Biochem. 135 (1983), pages 416-422.

On réalise le mélange suivant :

H2O distillée	62 µl
Tampon PCR (10x)	10 µl
dNTPs (2,5 mM chacun)	8 µl
Oligonucléotide SEQ ID NO:1 (20 µM)	5 µl
Oligonucléotide SEQ ID NO:2 (20 µM)	5 µl
ADN génomique (dilutions 10 <sup>-1</sup> à 10 <sup>-4</sup> )	10 µl
Taq-polymérase (5 U/µl)	0,2 µl

Le tampon PCR, sous la citation "(10x) Reaction Buffer composition", l'abréviation dNTPs, qui signifie tous les nucléotides dATP, dTTP, dGTP et dCTP, et le produit Taq-polymérase sont décrits dans la notice du kit vendu sous le nom "GENEAMP DNA AMPLIFICATION REAGENT KIT with AMPLITAQ Recombinant Taq DNA Polymerase" (PERKIN ELMER CETUS).

L'ADN génomique isolé de la souche d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916, est mis en oeuvre dans ce mélange à une concentration de 1 µg/µl.

La séquence codante de la glucose oxydase d'*Aspergillus foetidus* ATCC 14916 a été isolée selon la technique de la "PCR" (technique de la "Polymerase Chain Reaction" décrite dans SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., and ARNHEIM, N., SCIENCE, 37 (1985), pages 170-172).

Les séquences des oligonucléotides synthétiques mis en oeuvre lors de cette étude sont les suivantes :

SEQ ID NO:1

5' - TGATGATCAGGATCCGGCGGCCGCACCTCAGCAATGCAGACTCTCCTTGTGAGCTCGCTTGTG - 3'

BamHI NotI

20 SEQ ID NO:2

5' - TCGATGAAGCTTCACTCACTGCATGGAAGCATAATCTTCCAAGATAGCATC - 3'

SEQ ID NO:3

5' - GATGCTATCTTGAAGATTATGCTTCCATGCAGTGAGTGAAGCTTCATCGA - 3'

HindIII

La séquence SEQ ID NO:2 est le complément de la séquence

SEQ ID NO:3.

La séquence de l'oligonucléotide SEQ ID NO:1 contient les informations pour les sites de restriction BamHI et NotI, les informations pour la région 5' non-traduite de la glucoamylase  
5 d'*Aspergillus foetidus* SE4 et le debut de la séquence codante de la glucose oxydase.

La séquence de l'oligonucléotide SEQ ID NO:2 et, son complément, l'oligonucléotide SEQ ID NO:3 contiennent les nucléotides qui correspondent à la fin de la séquence codante de la  
10 glucose oxydase et les informations complémentaires pour le site de restriction HindIII.

La technique utilisée pour construire les oligonucléotides synthétiques est décrite dans BEAUCAGE, S.L. et al (1981), Tetrahedron Letters, 22, pages 1859-1882 et en utilisant des  
15  $\beta$ -cyanoéthyl phosphoramidites dans un appareil de BIOSEARCH CYCLONE SYNTHESIZER.

Les conditions suivies pour la "PCR" sont les suivantes : 2 minutes à 95 °C, puis 30 cycles d'une série comprenant 1 minute à 95 °C, 1 minute à 60 °C et 2 minutes à 72 °C, puis 10 minutes à  
20 72 °C, puis une température de 20 °C est maintenue. Tous les autres paramètres utilisés pour cette "PCR" correspondent à ceux décrits dans la notice du kit vendu sous le nom "GENEAMP DNA AMPLIFICATION REAGENT KIT with AMPLITAQ Recombinant Taq DNA Polymerase" (PERKIN ELMER CETUS).

25 Un fragment d'ADN d'environ 1,8 kb (1 kb = 1000 paires de bases) a été isolé comme décrit ci-dessus. Il a été comparé à l'aide de la technique de l'analyse par restriction (analyse décrite dans Molecular Cloning - a laboratory manual - MANIATIS et al., (Cold Spring Harbor Laboratory) 1982, pages 374-379) à la  
30 séquence publiée dans The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265 (7), pages 3793-3802. Aucune différence essentielle n'a été trouvée.

Le fragment d'ADN ainsi obtenu est digéré avec les enzymes de restriction BamHI et HindIII, puis est ligaturé, selon la  
35 technique de ligation décrite dans Molecular Cloning - a laboratory manual - SAMBROOK et al. - second edition, 1989, page

1.68-1.69, avec le plasmide pUC18 (CLONTECH laboratories, n° 6110-1), qui a été préalablement digéré aux sites BamHI et HindIII. Le vecteur pUCGOD (figure 1) est ainsi obtenu.

### Exemple 2

#### 5 Construction du plasmide pFGA2MUT

Le plasmide pFGA2MUT (figure 4) contient le gène de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus* SE4 dans lequel on a créé un site de clonage NotI entre le promoteur et la partie codante du gène de la glucoamylase, et un site de clonage HindIII entre la  
10 partie codante et le terminateur du gène de la glucoamylase. Ces deux sites de clonage NotI et HindIII sont créés par mutagénèse, comme décrit ci-après.

Le gène de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus* SE4 est isolé selon la description suivante.

15 L'ADN chromosomique de la souche d'*Aspergillus foetidus* SE4 est isolé selon la technique de GARBBER et al., comme décrit à l'exemple 1. Cet ADN chromosomique isolé est digéré partiellement avec l'enzyme de restriction Sau3A et les fragments ayant une taille de 8 à 10 kb sont isolés et purifiés par un gradient  
20 de sucrose (15 à 40 %) selon la technique décrite dans AUSUBEL, F.M. et al. (1989), Current Protocols in Molecular Biology (John WILLEY and Sons), pages 5.3.2-5.3.8. Ces fragments isolés et purifiés sont introduits dans le plasmide pBR322 (CLONTECH LABORATORIES catalogue n° 6210-1), qui a été préalablement digéré  
25 par l'enzyme de restriction BamHI. On transforme ensuite la souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$  (HANAHAN, D., J. Mol. Biol. (1983) 166, page 557 et BETHESDA RESEARCH LABORATORIES (BRL), B.R.L. Focus (1986) 8, page 9).

Environ 15000 clones d'*E. coli* transformés sont criblés à  
30 l'aide de la technique d'hybridation (SAMBROOK et al., pages 9.52 - 9.55) en utilisant l'oligonucléotide synthétique suivant (SEQ ID NO:4) :

5' - GATTCATGGTTGAGCAACGAAGCGA - 3'

On se base sur la séquence de nucléotides publiée par BOEL et al., EMBO J. 3 (1984), pages 1097-1102.

35 On isole une colonie qui hybride avec cet oligonucléotide.

On analyse les sites de restriction et on constate que cette souche contient le gène complet de la glucoamylase, c'est à dire le promoteur, le terminateur et la région codante ainsi que le signal de sécrétion.

5 On crée ainsi le vecteur pFGA1 (figure 2), qui contient un insert d'ADN d'*Aspergillus* de 8,7 kb. Cet insert est la seule différence entre le plasmide pBR322 et le vecteur pFGA1.

10 On construit, comme suit, un plasmide qui est dérivé du vecteur pFGA1 et qui contient un insert moins grand que celui du vecteur pFGA1. Un fragment EcoRI d'une taille de 5 kb contenant le promoteur (2kb), la région codante (2,2 kb) et le terminateur (0,8 kb) de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus* SE4 est isolé. Ce fragment EcoRI est ensuite inséré dans le plasmide pUC18. On crée ainsi le vecteur pFGA2 (figure 3).

15 On construit, comme suit, un plasmide qui est dérivé du plasmide pFGA2 et qui contient le gène de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus* SE4 dans lequel le promoteur et le terminateur sont séparés de la partie codante par des sites de restriction NotI et HindIII. Le promoteur et le terminateur de la glucoamylase d'*Aspergillus foetidus* SE4 sont séparés par des sites de restriction NotI et HindIII créés par deux mutagénèses dirigées suivant la procédure décrite dans la notice technique du kit de mutagénèse (BIORAD) "MUTA-GENE PHAGEMID in vitro Mutagenesis Kit".

25 Les oligonucléotides synthétiques utilisés au cours de cette procédure sont les suivants, respectivement SEQ ID NO:5 et SEQ ID NO:6 :

5' - GCCTGAGCTTCATCCCCAGCGGCGCCGCATCATTACACCTCAGCAATGT - 3'

NotI

5' - TGA CTGACACCTGGCGGTGAAAGCTTCAATCAATCCATTTTCGCTATAGTT - 3'

HindIII

30 On obtient ainsi le vecteur pFGA2MUT qui contient le site de restriction NotI au début de la région 5' non-traduite du gène de la glucoamylase et le site de clivage HindIII après le stop-codon dans la région 3' non-traduite de la glucoamylase.

Exemple 3

Construction du vecteur d'intégration

Suite à la digestion du plasmide pUCGOD obtenu comme décrit à l'exemple 1 avec les deux enzymes de restriction NotI et HindIII, un fragment contenant la séquence codante de la glucose oxydase et la région 5' non-traduite du gène de la glucoamylase d'Aspergillus foetidus SE4, est isolé.

La digestion des plasmides avec des enzymes de restriction est effectuée en suivant la technique décrite par SAMBROOK et al. 1989, chapitres 5.28-5.32.

Ce fragment est introduit dans le site de clonage NotI-HindIII du plasmide pFGA2MUT, obtenu comme décrit à l'exemple 2. Ce plasmide contient le promoteur et le terminateur du gène de la glucoamylase d'Aspergillus foetidus SE4, séparés par les sites de clonage NotI et HindIII, créés par mutagenèse dirigée. La partie codante de la glucoamylase est donc remplacée par la partie codante de la glucose oxydase.

Le vecteur pFGOD (figure 5) est ainsi obtenu. Ce vecteur pFGOD contient la séquence codante de la glucose oxydase, qui comprend son propre signal de sécrétion, sous le contrôle des signaux de transcription de la glucoamylase d'Aspergillus foetidus. Ce vecteur contient le système d'expression qui comprend les séquences suivantes :

- la séquence du promoteur de la glucoamylase d'Aspergillus foetidus SE4,
- la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase d'Aspergillus foetidus ATCC 14916,
- la séquence mature de la glucose oxydase d'Aspergillus foetidus ATCC 14916, et
- la séquence du terminateur de la glucoamylase d'Aspergillus foetidus SE4.

Exemple 4

Transformation de la souche d'Aspergillus foetidus SE4

La souche d'Aspergillus foetidus SE4 dérive de la souche d'Aspergillus foetidus ATCC 14916.

La souche d'Aspergillus foetidus ATCC 14916 est d'abord

soumis à un traitement de mutagénèse par ultra-violet selon la technique décrite dans PONTECORVO, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., MACDONALD, K.D., and BUFTON, A.W.J., *Advances in Genetics* 5 (1953), pages 141-238.

5 Les souches traitées sont étalées sur un milieu nutritif gélosé POTATO DEXTROSE AGAR (DIFCO) auquel a été ajouté l'amidon (5 % en poids/volume). Après une incubation de 48 heures à 32 °C, les colonies présentant un halo d'hydrolyse d'amidon le plus grand sont prélevées et repiquées sur le milieu nutritif  
10 gélosé. On isole une souche produisant beaucoup de glucoamylase. Cette souche nommée SE4 présente des conidies brunes décolorées.

Le vecteur pFGOD est ensuite introduit dans la souche d'*Aspergillus foetidus* SE4 par cotransformation selon la technique décrite dans CARREZ et al., *GENE*, 94 (1990), pages  
15 147-154.

Le plasmide p3SR2, qui contient le gène de l'acétamidase d'*Aspergillus nidulans* (*amdS*), est utilisé comme marqueur selectif.

Le plasmide p3SR2 est décrit dans Hynes, M.J., Corrick, C.M., and King, J.A., *Mol. Cell. Biol.*, 3 (1983), pages  
20 1430-1439. La transformation avec ce plasmide est décrite par KELLY, J.M. and HYNES, M.J., *EMBO J.* 4 (1985), pages 475-479.

La souche d'*Aspergillus foetidus* SE4 a été transformée avec des quantités équimolaires des plasmides p3SR2 et pFGOD.

25 Environ 350 souches transformées sont obtenues. Ces souches transformées sont sélectionnées sur le milieu gélosé A contenant de l'ABTS (BOEHRINGER) pour détecter la production de glucose oxydase. Les colonies des souches transformées qui sécrètent aussi la glucose oxydase dans le milieu de culture, sont  
30 entourées d'un halo vert après 2 heures d'incubation à 32 °C.

Le milieu A est formé du milieu CZAPEK DOX AGAR (DIFCO) auquel on ajoute 10 % (poids/volume) de glucose, 0,05 % (poids/volume) d'ABTS (2,2'-azino-di-(3-éthylbenzthiazoline sulfonate)), (BOEHRINGER) et 8 mg/l de peroxydase de raifort (46  
35 Purpurogallin Unités/mg, SIGMA).

Environ 40 % des souches transformées sécrètent la glucose

oxydase, elles ont donc intégré, dans leur génome, le vecteur de sélection p3SR2 et le vecteur d'intégration pFGOD.

#### Exemple 5

##### Isolement et purification des souches transformées

5 Les souches transformées présentant un halo le plus grand sont isolées et repiquées sur un milieu gélosé POTATO DEXTROSE AGAR (DIFCO). 50 souches transformées sont mises en culture à 32 °C sur ce milieu jusqu'à sporulation.

10 Les spores sont récoltées, diluées dans de l'eau physiologique puis étalées sur le milieu gélosé A de telle sorte que des colonies individuelles soient obtenues. Les colonies venant d'une seule spore et présentant un halo large sont repiquées sur le milieu gélosé POTATO DEXTROSE AGAR. Ces colonies sont mises en culture à 32 °C sur ce milieu gélosé jusqu'à sporulation.

15 Les conidies purifiées des souches transformées sont récoltées et conservées. Ces souches transformées d'*Aspergillus foetidus* sont dénommées SE4tr.

#### Exemple 6

##### Production de glucose oxydase par la souche transformée d'*Aspergillus foetidus* SE4tr

20 Les conidies purifiées, obtenues à l'exemple 5, sont mises en culture dans un milieu liquide riche contenant de l'extrait de malt (DIFCO) (2 % en poids), de la peptone (DIFCO) (0,1 % en poids), de l'amidon hydrolysé (10 % en poids) et du carbonate de calcium (3,5 % en poids). Le pH du milieu de culture est ajusté à un pH 6 par l'addition d'ammoniac. La culture est réalisée à 32 °C sous agitation et est suivie durant 5 jours.

30 Puis, la culture obtenue est centrifugée à 5000 tours/minute pendant 15 minutes (BECKMAN JA-10). On mesure l'activité enzymatique (glucose oxydase) de la biomasse, après avoir cassé et disloqué les cellules par broyage de la biomasse gelée avec de l'azote liquide, (production dite intracellulaire) et du surnageant (production dite extracellulaire) selon la technique décrite dans FIEDUREK, J., et al., *Enzyme Microb. Technol.* 8 (1986), pages 734-736.

35 Les résultats d'activité enzymatique obtenus sont comparés

avec ceux de la souche d'*Aspergillus foetidus* non transformée (souche SE4). La production intracellulaire de glucose oxydase de la souche transformée (souche SE4tr) en comparaison avec celle de la souche non transformée (souche SE4) est multipliée par un  
5 facteur de 5 à 10 et la production extracellulaire est multipliée par un facteur de 5000 à 10000.

On observe une forte augmentation de la production extracel-  
lulaire de glucose oxydase. En effet, la souche transformée  
sécrète presque la totalité de la glucose oxydase, qu'elle  
10 produit, dans le milieu de culture. La glucose oxydase produite par la souche non transformée n'est pratiquement pas sécrétée dans le milieu de culture. Une étape de dislocation des cellules de la souche non transformée est alors indispensable pour récu-  
pérer la glucose oxydase, ce qui n'est plus nécessaire avec la  
15 souche transformée selon l'invention. La production de glucose oxydase par la souche transformée SE4tr est substantiellement extracellulaire.

Par ailleurs, on ne détecte pratiquement pas de catalase  
dans le surnageant du milieu de fermentation obtenu après la  
20 culture de la souche transformée SE4tr.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES :

## (i) DEPOSANT :

- (A) NOM : SOLVAY (Société Anonyme)
- (B) RUE : rue du Prince Albert, 33
- (C) VILLE : Bruxelles
- (E) PAYS : Belgique
- (F) CODE POSTAL : 1050
- (G) TELEPHONE : (02) 509.61.11

(ii) TITRE DE L'INVENTION : Système d'expression, vecteur d'intégration et cellule transformée par ce vecteur d'intégration

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 6

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 63 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:1:

TGATGATCAG GATCCGGCGG CCGCACCTCA GCAATGCAGA CTCTCCTTGT GAGCTCGCTT 60  
 GTG 63

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 51 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:2:

TCGATGAAGC TTCACTCACT GCATGGAAGC ATAATCTTCC AAGATAGCAT C 51

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 51 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:3:

GATGCTATCT TGGAAGATTA TGCTTCCATG CAGTGAGTGA AGCTTCATCG A 51

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 25 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:4:

GATTCATGGT TGAGCAACGA AGCGA 25

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
  - (A) LONGUEUR : 49 paires de bases
  - (B) TYPE : acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
  - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:5:

GCCTGAGCTT CATCCCCAGC GCGGCCGCAT CATTACACCT CAGCAATGT 49

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
  - (A) LONGUEUR : 50 paires de bases
  - (B) TYPE : acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
  - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:6:

TGACTGACAC CTGGCGGTGA AAGCTTCAAT CAATCCATTT CGCTATAGTT 50

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

1 - Système d'expression utilisable pour la production extracellulaire de glucose oxydase, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - la séquence du promoteur de la glucoamylase,  
- la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase,  
- la séquence mature de la glucose oxydase, et  
- la séquence du terminateur de la glucoamylase.

10 2 - Système d'expression selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence du promoteur de la glucoamylase et la séquence du terminateur de la glucoamylase proviennent d'une souche de champignon filamenteux.

15 3 - Système d'expression selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase et la séquence mature de la glucose oxydase proviennent d'une souche de champignon filamenteux.

4 - Système d'expression selon la revendication 2 ou 3 caractérisé en ce que la souche de champignon filamenteux est une souche d'Aspergillus.

20 5 - Système d'expression selon la revendication 4 caractérisé en ce que la souche d'Aspergillus est une souche d'Aspergillus foetidus.

25 6 - Système d'expression selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence du promoteur de la glucoamylase et la séquence du terminateur de la glucoamylase proviennent de la souche d'Aspergillus foetidus SE4.

30 7 - Système d'expression selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence du signal de sécrétion de la glucose oxydase et la séquence mature de la glucose oxydase proviennent de la souche d'Aspergillus foetidus ATCC 14916.

8 - Vecteur d'intégration contenant le système d'expression selon l'une quelconque des revendications précédentes, et apte à permettre l'expression de la glucose oxydase

5 9 - Vecteur d'intégration selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide.

10 - Plasmide pFGOD.

11 - Cellule transformée par le vecteur d'intégration selon la revendication 8 ou 9 ou par le plasmide selon la revendication 10.

10 12 - Cellule transformée selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de champignon filamenteux.

13 - Cellule transformée selon la revendication 12 caractérisée en ce que la cellule de champignon filamenteux est une cellule d'Aspergillus.

15 14 - Cellule transformée selon la revendication 13 caractérisée en ce que la cellule d'Aspergillus est une cellule d'Aspergillus foetidus.

15 15 - Procédé pour la production extracellulaire de glucose oxydase caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 - transformation d'une cellule par un vecteur d'intégration contenant un système d'expression selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans des conditions permettant l'expression et la sécrétion de la glucose oxydase,

25 - culture de la cellule transformée dans un milieu de culture adéquat, et

- récupération de la glucose oxydase sécrétée.

16 - Souche isolée et purifiée d'Aspergillus foetidus SE4tr.

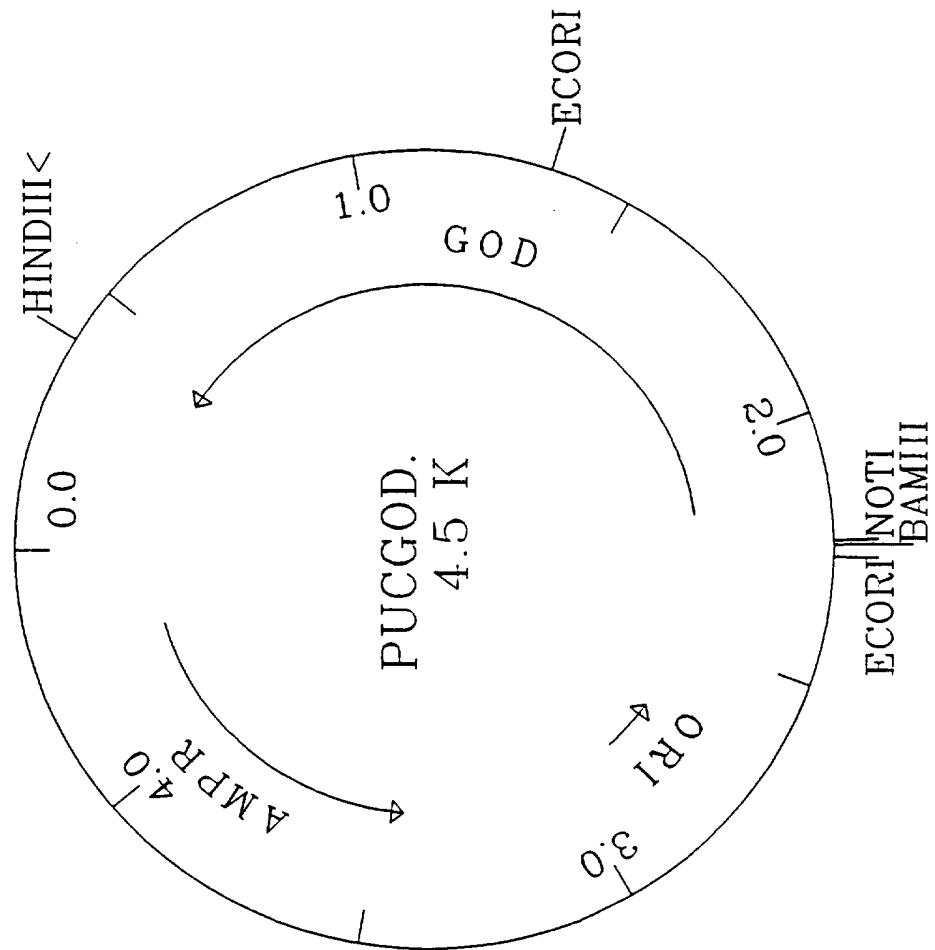


FIG. 1

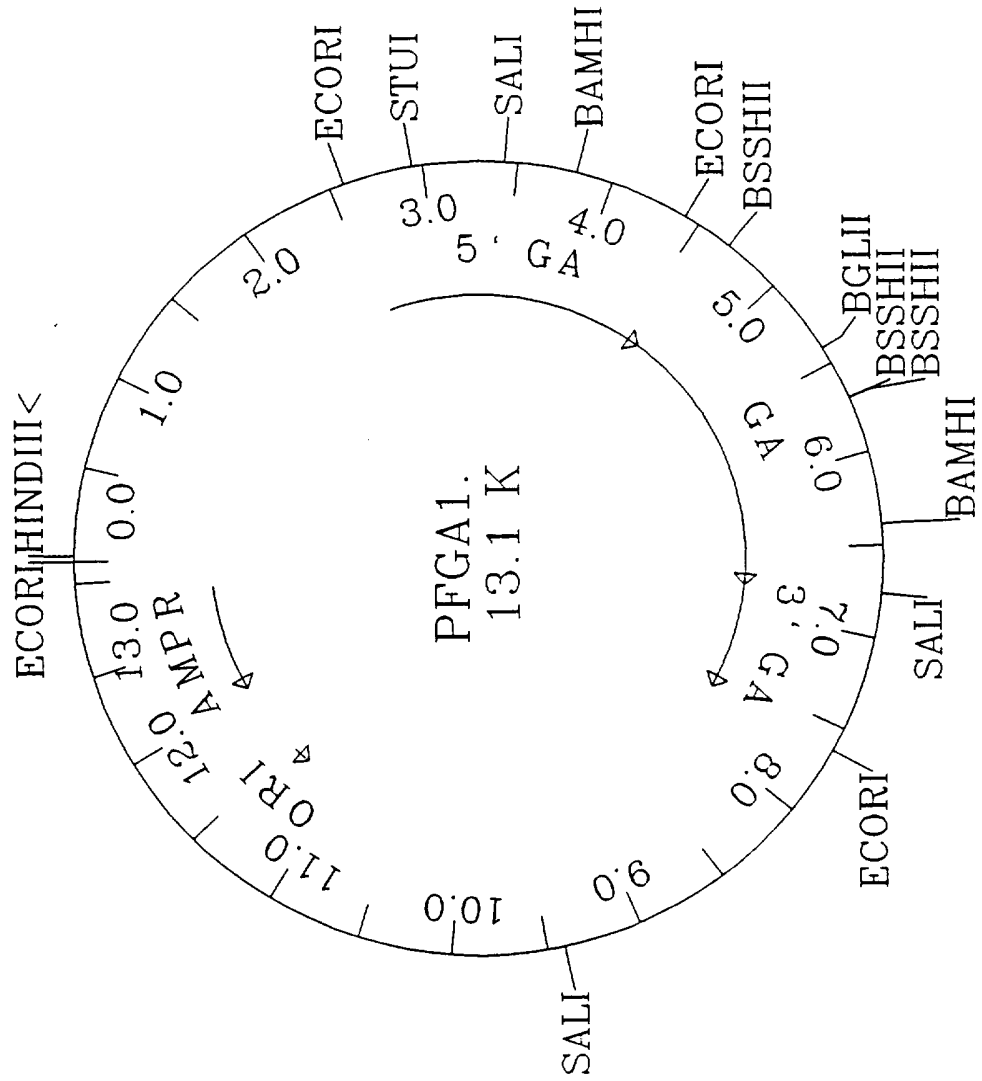


FIG. 2

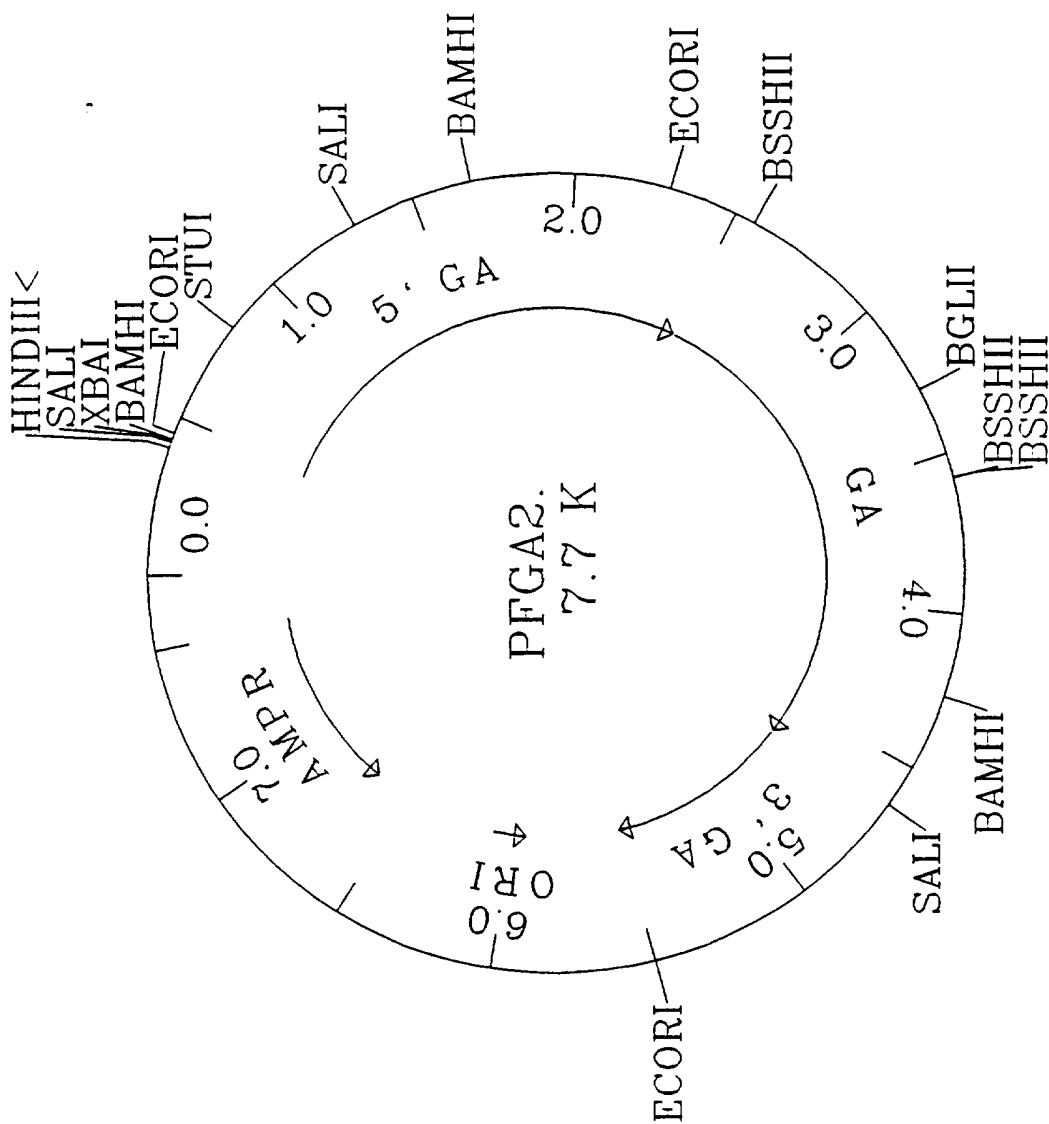


FIG. 3

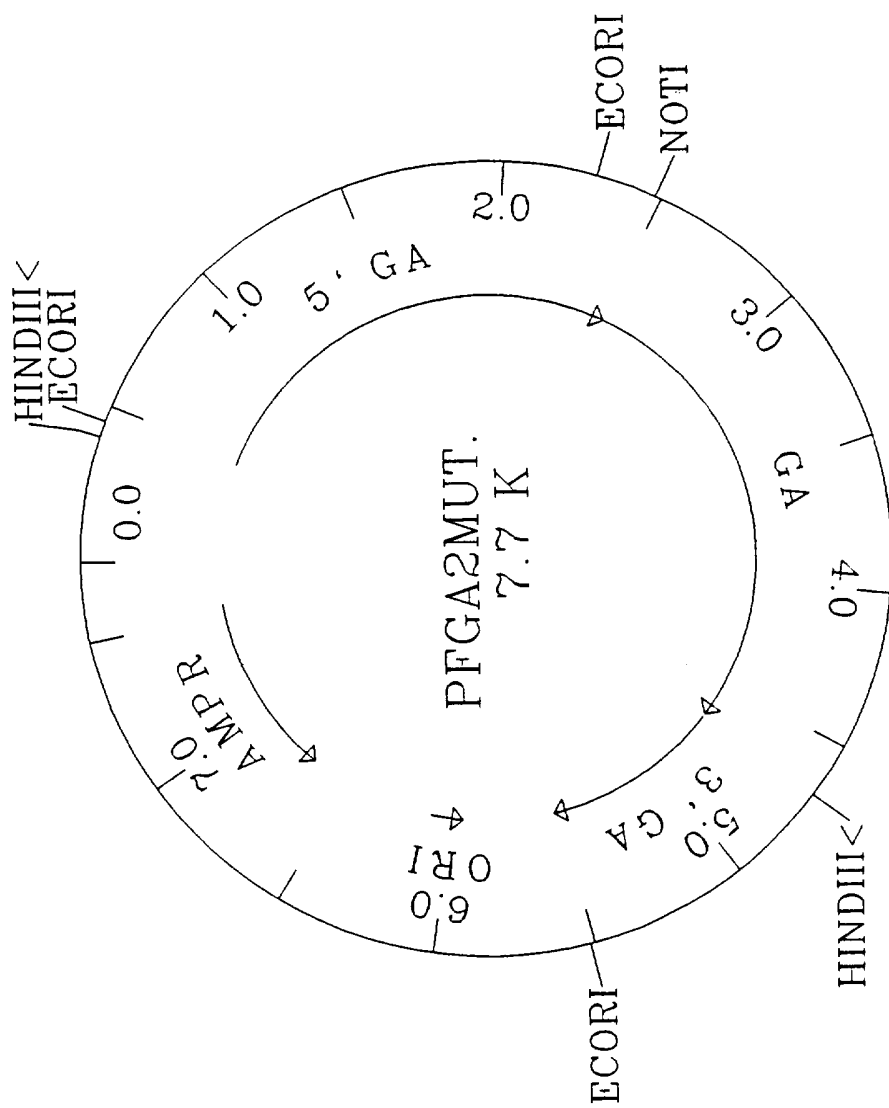


FIG. 4

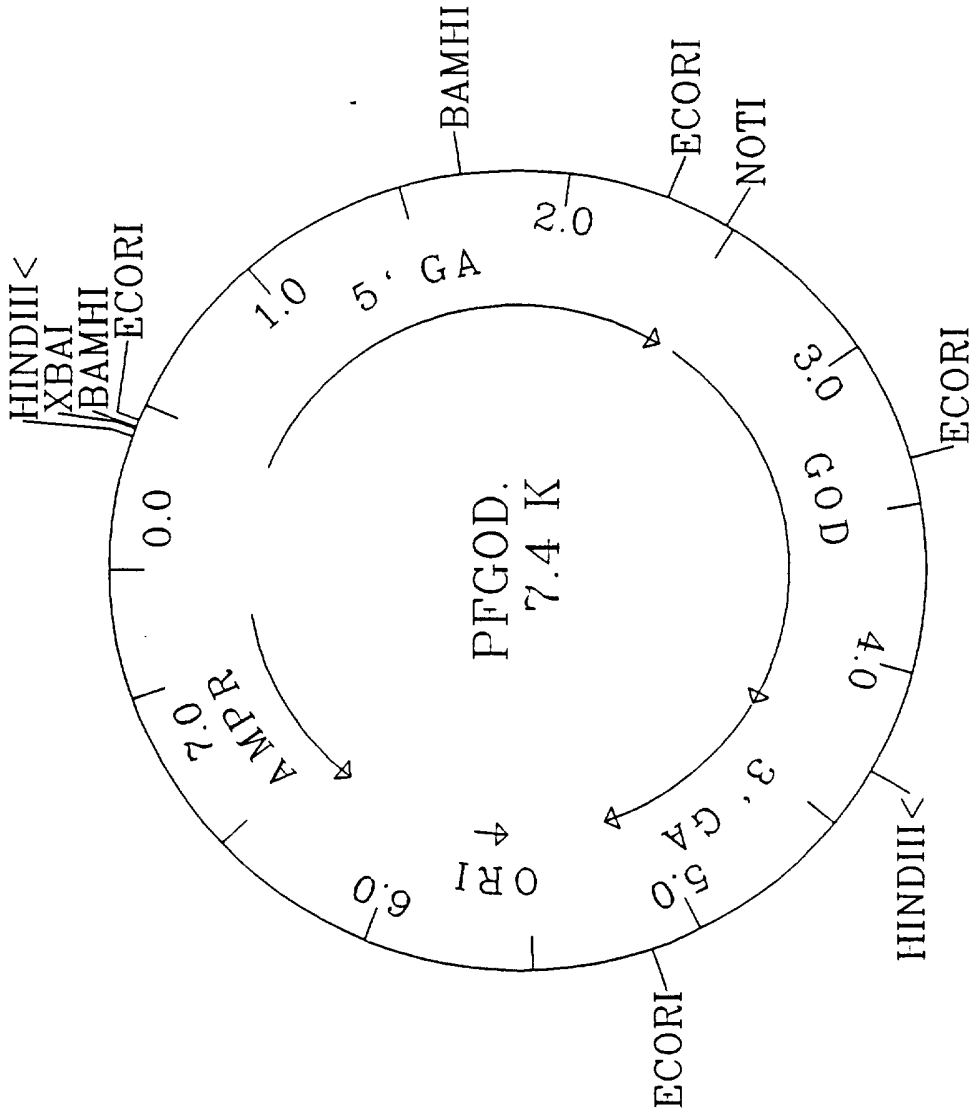


FIG. 5



Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BO 4987  
BE 9400102

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
Y,D	EP-A-0 357 127 (GIST-BROCADES N.V.) 7 Mars 1990 * page 4 lignes 27-31, lignes 41-42 * * pages 5 lignes 22-24, lignes 42-44 * ----	1-4, 8-13,15	C12N15/80 C12N15/53 C12N15/67 C12N1/15 C12N9/04 C12N9/34
Y,D	WO-A-89 12675 (CHIRON CORPORATION) 28 Décembre 1989 * page 19 - page 21 * * page 24, ligne 28 - ligne 36 * ----	1-4, 8-13,15	/(C12N9/04, C12R1:66), (C12N9/34, C12R1:66)
Y	EP-A-0 238 023 (NOVO INDUSTRI A/S) 23 Septembre 1987 * page 5, ligne 29 - ligne 30 * * page 6, ligne 6 - ligne 9 * * page 9; exemple 4 * * page 10 and 11 exemple 6 * ----	1-4, 8-13,15	
A	WO-A-93 18166 (GENENCOR INTERNATIONAL) 16 Septembre 1993 -----	1-4, 8-13,15	
			<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)</b>
			C12N C12R
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		30 Septembre 1994	Gac, G
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>			
X : particulièrement pertinent à lui seul		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

1  
EPO FORM 1503 01.92 (POM/CM)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 4987  
BE 9400102

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

30-09-1994

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0357127	07-03-90	AU-B- 636572	06-05-93
		AU-A- 4002189	22-02-90
		JP-A- 2174673	06-07-90
WO-A-8912675	28-12-89	US-A- 5094951	10-03-92
		EP-A- 0379556	01-08-90
		JP-T- 3500008	10-01-91
		US-A- 5266688	30-11-93
EP-A-0238023	23-09-87	DE-D- 3788524	03-02-94
		DE-T- 3788524	11-05-94
		DK-B- 169134	22-08-94
		EP-A- 0489718	10-06-92
		JP-A- 62272988	27-11-87
WO-A-9318166	16-09-93	AUCUN	