



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : <b>C12N 15/00, A01K 67/027, C12N 15/12, C07K 13/00, G01N 33/50, A61K 49/00, 31/00</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 94/28121</b>
		(43) Date de publication internationale: 8 décembre 1994 (08.12.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00594

(22) Date de dépôt international: 19 mai 1994 (19.05.94)

(30) Données relatives à la priorité:  
93/06105 21 mai 1993 (21.05.93) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JACOBS, Eric [BE/FR]; 107, Grand'Rue, F-67120 Dorlisheim (FR). LEGRAIN-JACOBS, Michèle [BE/FR]; 107, Grand'Rue, F-67120 Dorlisheim (FR). THEISEN, Manfred [DE/FR]; 30, rue des Carmes, F-67000 Strasbourg (FR). QUENTIN-MILLET, Marie-Josée [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). DANVE, Bernard [FR/FR]; 167, rue Joliot-Curie, F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée  
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NON-HUMAN TRANSGENIC ANIMAL EXPRESSING A TRANSFERRIN OF HUMAN ORIGIN

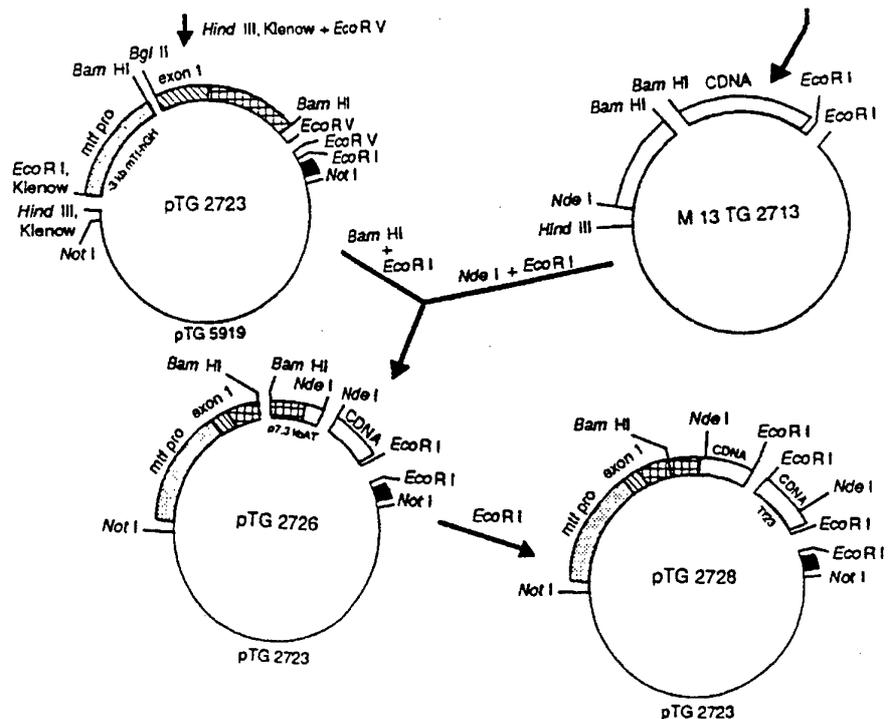
(54) Titre: ANIMAL NON-HUMAIN TRANSGENIQUE EXPRIMANT UNE TRANSFERRINE D'ORIGINE HUMAINE

(57) Abstract

The present invention relates to a transgenic animal in the genome of which is introduced a DNA fragment coding for a transferrin of human origin, particularly a precursor of a transferrin of human origin, placed under the control of elements which are necessary for its expression, and preparation process. The invention also relates to the utilization of such transgenic animal as animal model in order to evaluate or select a potential medicament intended to the treatment or prevention of an infection induced by a pathogenic organism having a receptor capable of binding a human origin transferrin.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un animal transgénique dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour une transferrine d'origine humaine, notamment un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et son procédé de préparation. L'invention a également pour objet l'usage d'un tel animal transgénique à titre de modèle animal pour évaluer ou sélectionner un médicament potentiel destiné au traitement ou à la prévention d'une infection induite par un organisme pathogène possédant un récepteur capable de fixer une transferrine d'origine humaine.



**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	B Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
ES	Espagne	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	ML	Mali	UZ	Ouzbékistan
FR	France	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ANIMAL NON-HUMAIN TRANSGENIQUE EXPRIMANT  
UNE TRANSFERRINE D'ORIGINE HUMAINE

5

10

15

La présente invention concerne un animal transgénique non-humain, et plus particulièrement une souris transgénique, en tant que modèle animal pour évaluer ou sélectionner des médicaments potentiels destinés à la prévention et au traitement des infections induites par des organismes pathogènes ayant développé un système de récepteurs spécifiques de la transferrine humaine pour capturer le fer nécessaire à leur croissance dans l'hôte infecté.

Les protéines appartenant à la famille des transferrines (Tf) jouent un rôle essentiel dans le métabolisme du fer. Elles interviennent dans l'absorption du fer, son transport et sa redistribution dans les différentes cellules et protéines d'un organisme. Le fer est un des métaux les plus abondants chez les eucaryotes et il est nécessaire à la croissance cellulaire. Certaines protéines essentielles à la vie d'un organisme lient spécifiquement un ou plusieurs atomes de fer et cette liaison est nécessaire à leur fonction. C'est le cas notamment de l'hémoglobine. L'ensemble du fer plasmatique est virtuellement transporté par son transporteur plasmatique, la transferrine.

La transferrine est codée par un gène unique. De nombreuses études tant *in vitro* qu'*in vivo*, ont établi la complexité de la régulation de ce gène. Des souris transgéniques dans lesquelles ont été injectés des gènes chimériques issus de la fusion de la région promotrice d'un gène de la transferrine et d'un gène reporteur

- 2 -

dont le produit d'expression est facilement mesurable, ont permis de mettre en évidence une multitude d'éléments contrôlant de manière positive et négative, l'expression tissu-spécifique et la régulation de ce gène. Ces éléments permettent de moduler le niveau de transcription du gène transferrine en réponse à divers stimuli, comme la concentration plasmatique en fer et certaines hormones (Idzerza et al., Molecular and Cellular Biol., 1989, 9, 5154-5162 ; Adrian et al., J. Biol. Chem., 1990, 265, 13340-13350).

La transferrine humaine est synthétisée majoritairement dans le foie, puis sécrétée dans la circulation sanguine. La transferrine est une glycoprotéine formée de deux domaines globulaires qui possèdent chacun un site de liaison au fer ferrique. Ainsi, on peut mettre en évidence dans la circulation sanguine, différents types de transferrine selon leur charge en fer. On peut détecter :

- la transferrine sous forme diférique dont chacun des domaines a lié un atome de fer,
- la transferrine monoférique dont l'un des domaines, soit le domaine N-terminal soit le C-terminal, a lié un atome de fer, et
- la transferrine dépourvue de fer, encore appelée apotransferrine.

On suppose qu'il existe différents mécanismes par lesquels la transferrine peut transférer le fer aux protéines cellulaires liant spécifiquement le fer. Ils dépendent entre autre du type cellulaire dans lequel le transfert a lieu et des conditions physiologiques. Un mécanisme particulièrement efficace, met en oeuvre un récepteur spécifique de la transferrine.

Ce récepteur est présent à la surface de certains types de cellules. Il présente une forte affinité pour la transferrine diférique et des affinités progressivement plus faibles pour respectivement les transferrines monofériques et l'apotransferrine. Après liaison au récepteur de la transferrine chargée en fer, le complexe est internalisé et passe dans des endosomes. L'acidification des endosomes contribue à la dissociation du fer et de la transferrine. Le processus de transfert du fer aux protéines cellulaires n'est pas connu.

Les micro-organismes, tout comme les cellules eucaryotes supérieures ont besoin de fer pour leur croissance. D'une manière générale, ils ont développé divers systèmes qui leur permettent de capturer le fer dans le milieu extérieur. Ainsi, la plupart des micro-organismes produisent des sidérophores à cet effet. D'autres  
5 micro-organismes ne produisent pas de sidérophores mais expriment à leur surface un récepteur spécifique de la transferrine qui leur permet de détourner et d'acquérir le fer lié à la transferrine. En particulier, des récepteurs spécifiques de la transferrine humaine ont été mis en évidence chez un certain nombre de micro-organismes pathogènes de l'homme. On peut citer notamment les bactéries  
10 pathogènes *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* et *Bordetella pertussis* ou les protozoaires pathogènes des genres *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* et *Plasmodium*.

15 Ces micro-organismes sont tous des pathogènes de l'homme responsables de maladies graves, comme par exemple des méningites souvent mortelles chez l'enfant, des pneumonies, des infections des voies génitales sexuellement transmissibles représentant une des causes majeures de stérilité chez la femme, la coqueluche et des maladies telles que la leishmaniose et la malaria qui touchent  
20 plusieurs millions de personnes dans les régions tropicales et subtropicales.

Il existe déjà un modèle de souris infectables par *Neisseria meningitidis* (Holbein, Infect. Immun., 1981, 34, 120-125 ; Schryvers et Gonzales, Infect. Immun., 1989, 57, 2425-2429). D'une manière générale, on administre tout d'abord à une souris,  
25 du fer complexé à la transferrine humaine (Fe-Tf). Puis on injecte une quantité déterminée en nombre de CFU (colony forming unit) de *Neisseria meningitidis*. Cette dernière étape est désignée étape d'épreuve bactérienne. Les bactéries sont cultivées en condition de carence en fer, ces conditions induisent l'expression des récepteurs spécifiques de la transferrine humaine à la surface des bactéries.

30 L'administration de Fe-Tf humaine permet la croissance des *Neisseria* dans la souris ainsi traitée. En effet, les récepteurs bactériens sont spécifiques de la transferrine humaine. *Neisseria meningitidis* ne peut capturer le fer lié à la transferrine endogène de souris puisque ses récepteurs ne peuvent lier la  
35 transferrine de souris. On suit l'évolution de l'infection bactérienne dans les souris en fonction du temps, par exemple par la mesure de la bactériémie sanguine

(comptage du nombre de bactéries par ml de sang prélevé des souris) ou par l'observation de l'état physiologique des souris (mauvais état à mortalité). Holbein rapporte que la mortalité dépend directement de la quantité de Fe-Tf humaine administrée. Dans ses conditions expérimentales, il obtient une mortalité de 100 % à partir de 17,5mg de Fe-Tf administrée par voie intrapéritonéale (IP). Schryvers et Gonzales recommandent une administration de 24mg de Fe-Tf préalablement à l'épreuve bactérienne.

Il est possible d'injecter le fer dans la souris sous d'autres formes, par exemple sous forme de dextran de fer. Dans ces conditions, les *Neisseria* se trouveront en excès de fer, ne produiront pas les récepteurs bactériens spécifiques de la transferrine humaine et pourront capter le fer par un simple phénomène de perméabilité. Il sera alors impossible d'évaluer ou sélectionner des médicaments potentiels agissant au niveau du récepteur bactérien.

Du fait de l'importance des pathologies induites par les micro-organismes tels que ceux énoncés ci-dessus, il est nécessaire de disposer de modèles expérimentaux qui permettent d'identifier des médicaments à leur rencontre et d'en évaluer l'efficacité. A l'aide de ces modèles, on pourra tester diverses substances, notamment celles qui peuvent agir au niveau des récepteurs bactériens, et ainsi trouver des médicaments susceptibles d'induire une protection efficace et durable à l'encontre de ces micro-organismes et de traiter les maladies qu'ils induisent.

On a maintenant généré des lignées de souris transgéniques produisant la transferrine humaine et on a trouvé que ces lignées pouvaient être utilisées à titre de modèle animal pour évaluer ou sélectionner des médicaments potentiels, plus particulièrement des vaccins, destinés à la prévention ou au traitement d'une infection telle que la méningite, maladie induite entre autre par la bactérie *Neisseria meningitidis*. Ceci n'était pas acquis d'emblée puisqu'il y a d'une part, une incertitude sur la capacité de la transferrine humaine à charger le fer dans un organisme de souris, et d'autre part, un risque d'interférence avec la transferrine de souris pouvant provoquer une éventuelle toxicité.

Enfin, les animaux transgéniques de la présente invention peuvent produire un taux de transferrine d'origine humaine proche de la concentration physiologique chez l'homme (aux environs de 1 à 2 mg/ml), ce qui permet de développer un modèle

- 5 -

reproduisant les conditions physiologiques par rapport aux modèles de l'art antérieur, qui eux impliquent une administration de Fe-Tf à des concentrations nettement supérieures, de l'ordre de 10 fois.

- 5 D'autre part, il est important de noter qu'un tel modèle animal devrait être d'un emploi simplifié et d'un coût raisonnable en comparaison avec le modèle animal actuellement en usage jusqu'à ce jour, qui implique une injection d'une quantité importante de transferrine chargée en fer aux animaux.
- 10 Par conséquent, l'invention a pour objet un animal transgénique non-humain dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour une transferrine d'origine humaine, notamment un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.
- 15 Par "éléments nécessaires au contrôle de l'expression d'un fragment d'ADN", on entend l'ensemble des éléments nécessaires à la transcription d'un fragment d'ADN en ARN et à la traduction de ce dernier en protéine. Parmi ceux-ci, la région promotrice revêt une importance particulière. En effet, selon un mode de réalisation avantageux, les éléments de contrôle utiles aux fins de la présente invention contiennent une région promotrice foie-spécifique, c'est-à-dire capable de
- 20 promouvoir avec efficacité l'expression d'un fragment d'ADN dans un nombre restreint de types cellulaires comprenant essentiellement les cellules hépatiques. En faisant usage d'une telle région promotrice, le fragment d'ADN pourrait être exprimé dans des cellules autres qu'hépatiques ; mais alors il le serait à un moindre
- 25 taux. A titre d'exemple de promoteur foie-spécifique, on peut notamment citer le promoteur du gène  $\alpha 1$ -antitrypsine ou celui du gène transferrine.

Afin de mettre en oeuvre un animal transgénique selon l'invention, il est particulièrement avantageux de choisir une région promotrice issue du genre ou de

30 l'espèce d'animal que l'on veut obtenir sous forme transgénique. Ainsi, une souris transgénique sera réalisée en utilisant la région promotrice d'un gène murin, de préférence d'un gène de souris et notamment le promoteur foie-spécifique du gène transferrine de souris.

- 35 Le fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine peut être :

- 5                   - De type génomique, tel que par exemple décrit par Schaeffer et al. (Gene, 1987, 56, 109-116) (17 exons séparés par 16 introns) ; il peut également s'agir d'un fragment similaire, modifié au niveau des introns, par exemple comportant une délétion partielle d'un ou plusieurs des 16 introns ;
- 10                   - De type ADN complémentaire (ADNc), c'est-à-dire dépourvu d'intron tel que décrit par Yang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 2752-2756) ; ou
- 15                   - De type minigène, c'est-à-dire mixte comprenant tout ou partie d'au moins un des 16 introns. Ce dernier type est plus particulièrement préféré. D'une manière tout à fait préférée, le fragment d'ADN de type minigène comprend le premier exon, le premier intron et les exons suivants (du 2<sup>ième</sup> au 17<sup>ième</sup>) sous forme d'ADNc.

20                   Selon un mode de réalisation avantageux, le fragment d'ADN est intégré dans le génome d'un animal transgénique selon l'invention, à l'extérieur du gène homologue codant pour la transferrine.

25                   Le précurseur pour lequel doit coder un fragment d'ADN utile aux fins de la présente invention, comprend essentiellement une transferrine d'origine humaine, sous forme mature, et un peptide signal fixé par liaison peptidique à l'extrémité NH<sub>2</sub> de la transferrine. Un peptide signal comporte généralement une séquence d'acides aminés principalement hydrophobe et a pour fonction de promouvoir la sécrétion dans le sang de la transferrine sous forme mature. Une fois sa fonction remplie, le peptide signal est éliminé par clivage.

30                   Dans le contexte de la présente invention, n'importe quel peptide signal peut être utilisé ; mais on utilise de préférence le peptide signal homologue codé par le gène humain de la transferrine.

35                   Par "transferrine d'origine humaine", on entend une protéine ayant les caractéristiques suivantes :

- Elle est capable de lier le fer ;

- Elle est capable de se lier au récepteur de la transferrine humaine ;
- Elle est capable de se lier au récepteur de la transferrine d'un micro-  
5 organisme ;
- Elle possède une séquence d'acides aminés qui présente un degré  
d'homologie d'au moins 80%, de manière avantageuse d'au moins 90%, de  
manière préférée d'au moins 95 % et de manière tout à fait préférée de  
10 100%, avec la séquence de la transferrine humaine native telle que montrée  
dans l'identificateur de séquence SEQ ID N0: 1, du résidu Valine en  
position 20 au résidu Proline en position 698.

Selon un mode avantageux, le fragment d'ADN code pour un précurseur de la  
15 transferrine humaine dont la séquence d'acides aminés est telle que montrée dans  
l'identificateur de séquence SEQ ID N0: 1, du résidu Méthionine en position 1 au  
résidu Proline en position 698.

Enfin une transferrine d'origine humaine est, de préférence, capable d'être reconnue  
20 par des anticorps spécifiques de la transferrine humaine. Ceci peut être mis en  
évidence selon des méthodes de détection immunologiques connues de l'homme de  
l'art, qui peuvent être mises en oeuvre avec des anticorps polyclonaux ou  
monoclonaux issus d'espèces variées et dirigés contre divers déterminants  
antigéniques de la transferrine humaine. A titre indicatif, une description détaillée  
25 d'un mode opératoire particulier d'un test ELISA est fournie ci-après (voir  
Exemple 2). Cette technique ELISA pourra notamment être mise en oeuvre pour  
évaluer la concentration sérique en transferrine d'origine humaine chez les animaux  
transgéniques selon l'invention. Selon un mode préféré de l'invention, un animal  
transgénique selon l'invention exprime une transferrine d'origine humaine à un taux  
30 sérique compris entre 0,1 et 5 mg/ml, de manière avantageuse 0,2 et 4 mg/ml et de  
manière préférée 0,3 et 3 mg/ml.

Un animal transgénique selon l'invention est de préférence un mammifère non-  
humain, plus particulièrement un rongeur, notamment un murin et de préférence  
35 une souris.

Par "animal transgénique selon l'invention", on entend un animal qui est transgénique pour un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine.

- 5 Un animal transgénique selon l'invention peut être un transgénique complet (le fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine est intégré dans le génome de toutes les cellules, somatiques et germinales, dudit animal ; ceci est par exemple le cas lorsque le fragment d'ADN est introduit dans un embryon au stade "une cellule") ou mosaïque (le fragment d'ADN est intégré  
10 dans le génome d'un certain pourcentage de cellules, mais pas dans toutes ; le pourcentage dépendra du nombre de cellules constituant l'embryon au moment de l'introduction du fragment d'ADN).

Par ailleurs, l'invention propose également:

15

- (i) Un premier procédé de préparation d'un animal simple transgénique selon l'invention, selon lequel :

20

- on introduit dans un embryon non-humain, un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, pour obtenir un embryon transgénique,

25

- on transplante ledit embryon transgénique dans un animal femelle pseudo-gestante,

30

- on permet audit embryon de se développer jusqu'à son terme, et
- on sélectionne au moins un animal simple transgénique dans le génome duquel est intégré un allèle dudit fragment d'ADN ; et

35

- (ii) Un deuxième procédé de préparation d'un animal double transgénique selon l'invention, selon lequel :

- on croise un animal mâle simple transgénique et un animal femelle simple transgénique, chacun obtenu par le premier procédé selon l'invention, et

- on sélectionne au moins un descendant double transgénique dans le génome duquel sont intégrés deux allèles du fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine.

5

Selon un mode préféré, les premier et deuxième procédés selon l'invention s'appliquent à la préparation de murins, plus particulièrement de souris, respectivement simple et double transgéniques.

- 10 L'introduction du fragment d'ADN au sein d'un embryon ainsi que l'implantation de l'embryon transgénique chez une femelle pseudo-gestante peuvent être mis en oeuvre selon les méthodes conventionnellement en usage.

- 15 D'une manière générale, un fragment d'ADN est introduit dans des cellules embryonnaires maintenues en culture ou dans un embryon comportant de préférence 1 à 8 cellules, de manière avantageuse 1 à 4 cellules et de manière préférée 1 cellule. Une méthode consiste à transfecter les cellules ou l'embryon par un virus recombinant, notamment un rétrovirus recombinant, dans le génome duquel est inséré le fragment d'ADN. Selon une autre méthode, on injecte le
- 20 fragment d'ADN tel quel dans l'embryon.

- Un animal transgénique selon l'invention peut être aussi un descendant d'un animal directement obtenu par un des procédés décrit ci-avant. En d'autres termes, un animal transgénique selon l'invention inclut l'animal fondateur ( $F_0$ ) d'une lignée
- 25 transgénique ainsi que les descendants du fondateur de première génération ( $F_1$ ) et des générations suivantes ( $F_2$  et suivantes).

- Les descendants peuvent être obtenus par croisement d'un animal transgénique selon l'invention avec un animal de la même espèce non transgénique. Dans ce cas,
- 30 environ la moitié des animaux issus de ce croisement comprendront un allèle du fragment d'ADN dans toutes leurs cellules germinales et somatiques, et par conséquent sont hétérozygotes.

- D'une manière alternative, les descendants peuvent également être obtenus par
- 35 croisement avec un autre animal transgénique selon l'invention, d'une lignée identique ou différente. Un tel croisement donne environ 25 % d'animaux double

transgéniques comportant deux allèles du fragment d'ADN. On s'attend à ce que le niveau d'expression du produit codé par le fragment d'ADN dans les animaux double transgéniques soit supérieur à celui observé chez des simple transgéniques. Les deux allèles peuvent être présents au niveau du même locus (double  
5 transgénique homozygote résultant du croisement de deux animaux transgéniques d'une même lignée). Ils peuvent également être situés en des loci différents du génome correspondant aux sites d'intégration du fragment d'ADN dans chacun des parents (double transgénique hétérozygote résultant du croisement de deux animaux transgéniques de lignées différentes).

10

Un animal double transgénique, tel que dérivé par exemple du deuxième procédé selon l'invention, peut être notamment identifié par les techniques classiques du génie génétique connues de l'homme de l'art, par exemple la technique de Southern ou par croisement "retour". Un tel croisement entre un animal double transgénique  
15 homozygote et un animal non transgénique, doit donner lieu à 100 % d'animaux simple transgéniques dans le génome desquels est intégré un allèle du fragment d'ADN.

Compte tenu de ce qui précède, on précise qu'un animal selon l'invention peut donc  
20 être simple, double ou multi-transgénique pour le fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine. Un animal selon l'invention est avantageusement un double transgénique, préférentiellement homozygote.

Enfin l'invention a pour objet :

25

(i) L'usage d'un animal transgénique selon l'invention, à titre de modèle animal pour évaluer ou sélectionner un médicament potentiel destiné à la prévention ou au traitement d'une infection induite par un organisme pathogène possédant un récepteur capable de fixer une transferrine d'origine humaine ;  
30 et

(ii) Un procédé pour évaluer ou sélectionner un médicament potentiel destiné à la prévention ou au traitement d'une infection induite par un organisme pathogène possédant un récepteur capable de fixer une transferrine d'origine humaine, procédé selon lequel :  
35

- 11 -

- a) on administre à un animal transgénique selon l'invention ledit médicament, avant pendant ou après l'administration d'une quantité déterminée dudit organisme pathogène, et
- 5 b) on mesure l'évolution de l'infection pendant une période d'au moins 24 heures après l'étape a) pour évaluer l'activité et éventuellement sélectionner le médicament donnant les meilleurs résultats.

L'invention concerne également les médicaments mis en oeuvre par le procédé  
10 précédent.

Dans le contexte de la présente invention, un médicament potentiel peut être une substance de toute nature, chimique ou bien biologique telle qu'un anticorps ou un agent vaccinal ; ce peut être aussi un mélange de substances.

15 Un organisme pathogène possédant un récepteur capable de fixer une transferrine d'origine humaine peut être une bactérie pathogène telle que *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* et *Bordetella pertussis* ou un protozoaire pathogène du genre *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* et *Plasmodium*. Dans le  
20 contexte de la présente invention, un organisme pathogène de choix est *Neisseria meningitidis*.

Le médicament potentiel peut être administré à l'animal en dose unique ou  
25 répétées, plusieurs fois après un certain délai d'intervalle ; par n'importe quelle voie d'administration communément en usage ; de façon préalable, concomitante ou postérieure à l'étape d'épreuve par l'organisme pathogène. Lorsqu'il s'agit d'un agent utilisé à titre préventif, notamment un agent vaccinal, ce dernier sera administré de façon préalable à l'administration du micro-organisme pathogène.  
30 Dans les autres cas, le médicament sera administré de façon préalable, concomitante ou postérieure à l'étape d'épreuve.

L'étape d'épreuve s'effectue en administrant une quantité appropriée et  
préalablement déterminée d'un organisme pathogène, le plus souvent en dose  
35 unique et par n'importe quelle voie d'administration communément en usage. On préférera néanmoins, la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale. La quantité à

administrer doit être suffisante pour déclencher chez un animal contrôle (pas d'administration préalable de médicament), un état pathogène qui peut se signaler de différentes manières (poil hérissé, mobilité réduite, prostration, mort) ; elle dépend de divers facteurs tels que l'espèce animal ou l'organisme pathogène. Elle  
5 peut être déterminée selon les pratiques générales d'un homme du métier. Dans le cas d'une infection bactérienne, on recherchera par exemple, la dose minimale qui induit une bactériémie significative.

A titre d'exemple, on indique qu'il convient d'administrer à une souris transgénique,  
10 par voie intrapéritonéale, une suspension de *Neisseria meningitidis* titrant de  $1.10^5$  à  $1.10^8$  CFU, de manière avantageuse de  $1.10^6$  à  $5.10^7$  CFU et de manière préférée, environ  $1.10^7$  CFU. Cette suspension sera obtenue de préférence par culture de la bactérie dans un milieu carencé en fer.

15 Un procédé selon l'invention peut également comprendre une étape optionnelle, dite "étape de surcharge". On administre alors à l'animal une quantité réduite de transferrine humaine chargée en fer (Fe-Tf) préalablement ou de façon concomitante à l'étape d'épreuve. Cette administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée plusieurs fois et peut se faire par n'importe quelle voie  
20 d'administration communément en usage, de préférence par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. La quantité de Fe-Tf que l'on administre est de 0,5 à 6 mg, de manière avantageuse de 0,6 à 5 mg et de manière préférée de 1 à 4 mg.

Un procédé selon l'invention destiné à l'évaluation d'un agent vaccinal bactérien  
25 peut être par exemple mis en oeuvre dans le cadre de l'expérience décrite ci-après en des termes généraux.

Des animaux transgéniques selon l'invention sont répartis en plusieurs lots d'épreuve. Chaque animal d'un même lot reçoit une dose déterminée de l'agent  
30 vaccinal à tester. La dose varie en fonction des lots. Un lot témoin positif est constitué en parallèle ; les animaux transgéniques de ce lot ne reçoivent pas le vaccin à tester.

De même on peut constituer un lot témoin négatif avec des animaux de la même  
35 espèce non transgéniques qui ne reçoivent pas l'agent vaccinal à tester.

Environ 15 à 20 jours après, les animaux de tous les lots reçoivent une dose déterminée de la bactérie. L'absence d'infection ou sa progression est enregistrée selon différents paramètres tels que la bactériémie et l'état physiologique des animaux. L'agent vaccinal est considéré comme protecteur lorsque la bactériémie mesurée chez les animaux transgéniques des lots d'épreuve est réduite de manière significative par rapport à celle mesurée chez les animaux transgéniques du lot témoin positif ; ou lorsque l'état physiologique des animaux des lots d'épreuve est notablement amélioré (se manifestant par exemple par un pourcentage de mortalité réduit) par rapport à celui des animaux du lot témoin positif.

10

Chez les animaux du lot témoin négatif, les bactéries ne peuvent pas proliférer avec efficacité en raison de leur incapacité à s'approvisionner en fer. La bactériémie que l'on observe est faible (inférieure au nombre de CFU injecté), transitoire et suivie d'une phase de clearance rapide. L'infection n'a aucun effet en principe sur la survie de ces animaux.

15

Bien évidemment, plus la bactériémie et l'état physiologique des animaux d'épreuve se rapproche de ce qui est observé dans le lot témoin négatif, plus l'agent vaccinal ou sa dose doit être considéré comme efficace. Dans un lot d'épreuve, une bactériémie est considérée comme élevée lorsque elle est supérieure d'au moins un facteur 100, 1000 ou 10 000 à celle observée dans le lot témoin négatif ; ceci dans des conditions de mesure strictement parallèles.

20

L'invention est illustrée ci-après et par référence à la figure suivante.

25

La Figure 1 représente schématiquement la construction du fragment d'ADN codant pour le précurseur de la transferrine humaine en précisant les sites de restriction utilisés dans les étapes de clonage ; la région promotrice du gène murin de la transferrine (mTf pro) est indiquée par des pointillés ; l'exon 1 du gène humain de la transferrine est représenté par une zone hachurée ; l'intron 1 par une zone quadrillée ; la partie ADNc par une boîte blanche ; et la région de terminaison de la transcription de SV40 par une boîte noire. La localisation des séquences correspondant aux oligonucléotides utilisés lors des étapes de construction est indiquée.

30

35

EXEMPLE 1 : Préparation du plasmide pTG2728 comportant un minigène codant pour le précurseur de la transferrine humaine

L'exemple a trait à la construction d'un plasmide comportant un minigène codant pour le précurseur de la transferrine humaine (hTf) placé sous le contrôle du promoteur du gène de la transferrine murine (mTf). (Figure 1)

La partie promotrice est isolée du plasmide -3kb mTf-hGH (Idzerda et al., Mol. Cell. Biol., 1989, 9, 5154-5162), le fragment génomique comportant l'exon 1, l'intron 1 et une portion 5' de l'exon 2 du plasmide p7.3kb AT. Ce dernier résulte du clonage du fragment génomique comprenant les exons 1 et 2 du gène de la transferrine humaine issu du phage TfkA<sub>2</sub> (Schaeffer et al, Gene, 1987, 56, 109-116) dans le vecteur pAT153/PvuII/8 (Anson et al., EMBO J., 1984, 1053-1060). La région ADNc provient du plasmide T23 (Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 3149-3153). L'ensemble des étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens est réalisé par passage dans la souche *Escherichia coli* (*E. coli*) 5K, alors que celles qui mettent en oeuvre des vecteurs dérivés du phage M13 sont réalisées par passage dans *E. coli* NM522.

Un site *Bgl*III est créé en amont de l'ATG initiateur du gène hTf par mutagenèse dirigée. La mutagenèse est réalisée par PCR en utilisant l'oligonucléotide mutagène OTG3320 dont la séquence est reportée dans la SEQ ID NO: 2. On utilise le vecteur M13TG1779 en tant que matrice. Ce dernier provient du clonage du fragment génomique *Bam*HI de 1,1 kb isolé de p7.3 kb AT (comprenant l'exon 1, l'intron 1, l'exon 2 et la partie 5' de l'intron 2 du gène hTf) dans le site de *Bam*HI de M13mp19 (Gibco BRL). La mutagenèse met en oeuvre une amorce reverse, complémentaire à une séquence du vecteur M13mp19 et proche du site de clonage. L'amorce reverse désignée OTG3321 est décrite dans la SEQ ID NO: 3. On réalise 30 cycles d'amplification.

Le fragment généré est vérifié sur gel d'agarose et digéré par les enzymes *Bgl*III et *Bam*HI. Ce dernier est inséré entre les mêmes sites du vecteur p polyI<sup>+</sup> (Lathe et al., Gene, 1987, 57, 193-201) générant le vecteur pTG2715. La séquence du fragment *Bgl*III-*Bam*HI est vérifiée.

- 15 -

Le vecteur -3kb mTf-hGH qui comprend la région promotrice du gène mTf est digéré par *EcoRI* puis traité à la polymérase Klenow afin de générer des extrémités franches. Il est ensuite digéré par *BamHI*. Le fragment généré comportant 3kb de région promotrice du gène mTf, et le fragment *BgIII-EcoRV* isolé de pTG2715 sont intégrés entre le site *HindIII* traité à la polymérase Klenow et le site *EcoRV* de pTG5919. Cette insertion détruit les sites *BgIII* et *BamHI* qui possèdent des extrémités compatibles. Il en résulte le vecteur pTG2723.

Le plasmide pTG5919 résulte de l'insertion du fragment *BgIII* de 0,15kb comportant la séquence de terminaison de transcription du virus SV40 (Simian virus 40), dans le site *BamHI* de p polyIII I\* (Lathe et al., supra). Ce plasmide est issu de pTG173 (décrit dans la demande européenne 298 807) et comprend notamment la séquence de terminaison de SV40 mais se distingue de pTG173 au niveau des sites de restriction qui encadrent ladite séquence : respectivement en 5' un site *BgIII* et en 3' les sites *SalI*, *PstI* et *BgIII*. Tout autre plasmide comportant la même séquence de terminaison et des sites de restriction adéquates pourrait être utilisé.

Par ailleurs, un fragment s'étendant du codon 25 au site *BamHI* recouvrant les codons 90 et 91 (le codon +1 représente le premier acide aminé de la transferrine humaine mature) est généré par synthèse chimique. Les 6 oligonucléotides utilisés OTG3336 à 3341 sont reportés dans les SEQ ID NO: 4 à 9. L'oligonucléotide de la SEQ ID NO: 4 contient en amont un site *HindIII* pour faciliter le clonage du fragment synthétique. Le fragment synthétique *HindIII-BamHI* ainsi constitué est sous-cloné dans le vecteur M13mp19 donnant le vecteur M13TG1787 et sa séquence est vérifiée.

La séquence ADNc en aval du site *BamHI* provient du clone Tf23. Ce dernier comprend la région codante de la transferrine humaine à partir du codon 98 et une séquence 3' non-codante de 138pb. Les séquences comprises entre le site *BamHI* et le codon 98 sont ajoutées par PCR.

La réaction de PCR met en oeuvre l'amorce OTG3343 reportée dans la SEQ ID NO: 10, l'amorce reverse OTG3344 de la SEQ ID NO: 11 comprenant le site *EcoRI* interne de l'ADNc hTf et le clone Tf23 en tant que matrice. Le fragment PCR généré, après digestion par les enzymes *BamHI* et *EcoRI*, est introduit entre

les mêmes sites de M13TG1787. La séquence du vecteur M13TG2713 en résultant est vérifiée.

Le fragment *Bam*HI-*Nde*I isolé de p7.3kb AT (comprenant la partie 3' de l'intron 1  
5 et la partie 5' de l'exon 2) ainsi que le fragment *Nde*I-*Eco*RI isolé de M13TG2713  
sont insérés dans le vecteur pTG2723 digéré par *Bam*HI et *Eco*RI. Il en résulte le  
plasmide pTG2726. La séquence ADNc codant pour la transferrine humaine est  
complétée en insérant le fragment *Eco*RI isolé de Tf23 dans le vecteur pTG2726.  
Le vecteur en résultant et présentant une orientation correcte du fragment *Eco*RI  
10 est désigné pTG2728.

EXEMPLE 2 : Souris transgéniques exprimant la transferrine humaine.

A. Obtention de souris simple transgéniques hétérozygotes

15 Le plasmide pTG2728 est purifié sur gradient de chlorure de césium et digéré par  
*Not*I de manière à obtenir un fragment d'ADN comportant un minigène codant  
pour le précurseur de hTf sous le contrôle de 3kb de région promotrice du gène  
mTf. Le fragment *Not*I est purifié sur gradient de sucrose et injecté dans le  
20 pronucléus mâle d'un oeuf fertilisé de souris hybrides de 2<sup>ème</sup> génération issues du  
croisement d'une souris femelle C57/B16 avec un mâle SJL selon la technique  
connue de l'homme du métier. Chaque oeuf est ensuite réimplanté dans l'utérus  
d'une souris pour que la gestation soit poursuivie.

25 L'ADN des tissus de la queue des nouveau-nés est isolé de manière à vérifier  
l'intégration du transgène dans le génome de l'animal par analyse Southern  
(Southern, E, J. Mol. Biol., 1975, 98, 503). L'ADN génomique ainsi obtenu est  
digéré par l'enzyme *Eco*RI et le mélange de digestion est séparé sur gel d'agarose  
1%. Après transfert sur membrane Hybond N+ (Amersham), l'ADN est hybridé en  
30 utilisant une sonde appropriée spécifique du gène hTf marquée à l'isotope <sup>32</sup>P. La  
sonde est constituée par le fragment *Bam*HI-*Eco*RI de 0,6kb isolé de M13TG2713.  
Dans les conditions de stringence classiquement utilisées, on n'observe aucune  
hybridation croisée avec le gène endogène transferrine de souris. L'analyse des  
résultats montre que le transgène est intégré dans le génome de 12 souris sur les 86  
35 analysées.

Des lignées transgéniques sont établies à partir de 7 fondateurs. On génère des descendants hétérozygotes par croisement de chacun des fondateurs avec des souris hybrides non-transgéniques C57/Bl6 x SJL. La transmission aux descendants est également vérifiée par Southern. Le nombre de copies du transgène est stable  
5 d'une génération à l'autre, et on ne détecte aucun réarrangement.

Du sang est prélevé sur les souris positives au test d'hybridation et le niveau d'expression de la transferrine humaine dans le sérum est déterminé par la méthode ELISA décrite ci-après.

10

B. Détermination de la concentration sérique de transferrine humaine dans les souris transgéniques.

100µl d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-transferrine humaine (Sigma, référence T-6265) préalablement dilué 100 fois dans un tampon PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,008M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,002M, NaCl 0,15M, pH7,2), sont déposés au fond de chaque puit d'une plaque de microtitration de 96 puits (Nunc) et incubés à 4°C pendant 16h. Les anticorps non adsorbés sont éliminés par lavages extensifs avec un tampon PBS comprenant 0,2 % de Tween 80. Les puits sont saturés par addition  
20 de 50µl de BSA 2 % dissoute dans un tampon PBS. Après 10mn, on ajoute 50µl d'une solution PBS-Tween 4 % et 100µl de dilution d'échantillons de sérum prélevés d'une souris positive au test d'hybridation. Les plaques sont incubées 2h à température ambiante, et lavées extensivement avec le tampon PBS-Tween 0,2 %. On les incube ensuite 2 heures à température ambiante avec 100µl d'un anticorps  
25 de mouton anti-transferrine humaine couplé à la peroxydase (Binding Site Limited, référence PPO70) dilué 1000 fois dans un tampon PBS-Tween 0,2 %. Après lavages extensifs dans les mêmes conditions que précédemment, l'activité enzymatique peroxydase est révélée par addition de 100µl de la préparation suivante ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,066M,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  0,035M, pH5, 0,04 % d'ortho-phénylendiamine et 0,014 % de peroxyde d'hydrogène). La réaction est stoppée par  
30 addition de 150µl d'une solution  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. L'absorbance est mesurée à 490nm.

La quantité de transferrine d'origine humaine contenue dans le sérum des animaux transgéniques est établie en fonction d'une gamme d'étalonnage préparée comme  
35 suit : une solution de transferrine humaine purifiée (Sigma, référence T-3400) préparée à une concentration de  $5 \times 10^{-5}$  mg/ml est diluée de 2 en 2 dans du

tampon PBS. L'absorbance est mesurée pour chacune des dilutions et la courbe d'étalonnage est établie (ng de transferrine humaine en fonction de l'absorbance).

Le mode opératoire ci-dessus décrit permet de détecter jusqu'à 1ng de transferrine humaine. Le test est spécifique de la transferrine humaine et ne montre pas de réaction croisée avec de la transferrine de souris.

Le niveau d'expression des animaux fondateurs ( $F_0$ ) varie en moyenne et selon les lignées entre 0,16 et 0,40mg/ml. D'une manière générale, l'expression est légèrement augmentée chez les animaux de première génération ( $F_1$ ) et atteint 0,40 à 0,75mg/ml, reflétant le mosaïsme des fondateurs. Puis pour les lignées pour lesquelles les descendants de 2<sup>ième</sup> génération ( $F_2$ ) sont générés, le taux d'expression est relativement stable à l'exception d'une lignée.

#### 15 C. Etablissement de lignées de souris double transgéniques homozygotes

Les souris homozygotes sont générées en croisant des frères et des soeurs provenant d'une même lignée transgénique. On détermine les animaux homozygotes par Southern blot quantitatif effectué sur les tissus de queue prélevés des descendants dudit croisement. De plus, les homozygotes sont confirmés par croisement "retour" avec des souris hybrides non transgéniques, qui doit donner 100 % de descendants simples transgéniques. On a généré des souris homozygotes à partir de différentes lignées. Les homozygotes issus de la lignée 13 présentent un niveau d'expression de la transferrine humaine augmenté d'un facteur proche de 2 par rapport à celui des simple transgéniques parents. Les souris homozygotes de la lignée 13 produisent environ 1mg/ml de transferrine humaine (la concentration sérique mesurée dans 4 animaux varie de 0,92 à 1,2mg/ml).

#### 30 EXEMPLE 3 : Usage des souris transgéniques à titre de modèle animal pour l'infection de *Neisseria meningitidis*.

On utilise la souche *Neisseria meningitidis* B16B6 à titre de souche d'épreuve. Les bactéries sont cultivées sur boîte de gélose Mueller-Hinton pendant 16 heures à 37°C sous 10 % de CO<sub>2</sub>. Puis on réalise une culture en milieu liquide en mettant en suspension des colonies précédemment obtenues dans un milieu BMH (bouillon Mueller-Hinton) pH6,6, EDDA (Ethylènediamine-di O-hydroxyphényl-acetic acid,

Sigma) 30  $\mu\text{M}$  à une  $\text{DO}_{680}$  (densité optique mesurée à 680 nm) d'environ 0,2. Les bactéries sont ainsi cultivées en condition de carence de fer pendant 4 heures à 37°C sous agitation. L'absorbance à 680nm est précisément mesurée. Elle se situe en général aux environs de 1.

5

On ajuste la suspension à une concentration de  $2.10^7$  CFU/ml, sachant qu'une suspension de germes à  $1.10^9$  correspond à une densité optique mesurée à 680 nm de 0,5. La suspension est préparée dans un milieu  $\phi$ TTG [eau physiologique tamponnée (Aguettant), Tryptone 1‰ (DIFCO) et gélatine 1‰ (Bio-Mérieux)].

10 L'équivalence entre absorbance et nombre de CFU est vérifiée par numération sur milieu gélosée.

La virulence de la souche est contrôlée à chaque expérimentation. Ce contrôle est effectué sur des groupes de 8 souris  $\text{CD}_1$  femelles (Charles River) âgées de 8  
15 semaines et prétraitées à la Fe-Tf. On administre à ces souris par voie IP 0,5ml d'une solution de transferrine humaine à 48 mg/ml saturée en fer (Intergen, ref 4455-00, holoform, pureté environ 98 %) quelques minutes avant l'épreuve bactérienne. Puis on leur injecte 0,5 ml de doses progressives de raison 10 de la suspension bactérienne (en général de  $1.10^3$  à  $1.10^7$  CFU/souris) par voie IP. La  
20 létalité est enregistrée pendant les 5 jours suivants. On détermine la dose létale 50 (DL50) de la suspension bactérienne, c'est à dire la dose de bactérie à laquelle 50 % des animaux ainsi traités meurent. D'une manière générale la DL50 de la souche *Neisseria meningitidis* B16B6 se situe aux environs de  $5.10^4$  CFU.

25 Les souris sont réparties en différents groupes :

(1) des souris non-transgéniques et non traitées à la Fe-Tf. Ce groupe qui comprend en général 5 souris, constitue le témoin négatif d'infection,

30

(2) des souris non-transgéniques auxquelles on administre quelques minutes avant l'épreuve bactérienne et par voie IP 24mg de Fe-Tf (comme indiqué dans le paragraphe précédent). Ce groupe qui comprend environ 5 souris correspond au modèle divulgué dans l'art antérieur et constitue le témoin positif d'infection, et

35

- 20 -

(3) des souris transgéniques qui expriment une concentration sérique de hTf de 0,3 à 0,6mg/ml.

5 (4) On peut également inclure, de manière facultative, un groupe supplémentaire constitué par des souris transgéniques, auxquelles on administre une quantité très réduite de Fe-Tf (1,3mg) par voie IP.

10 On administre à l'ensemble des souris 0,5ml de la suspension bactérienne, soit environ  $1.10^7$  CFU/ml. L'administration est réalisée par voie IP et représente le temps 0 ( $t=0$ ) de l'expérimentation.

15 Des prises de sang sont effectuées au niveau du sinus rétro orbitaire à intervalle de temps régulier. L'échantillon est dilué immédiatement au 1/10 dans le milieu  $\phi$ TTG et des dilutions progressives de raison 10 sont ensuite effectuées dans le même diluant. On évalue le nombre de bactéries en déposant pour chaque dilution 4 gouttes de 25 $\mu$ l sur gélose Mueller-Hinton supplémentée. Après incubation une nuit à 37°C sous CO<sub>2</sub> 10%, les colonies sont comptées. Les résultats sont exprimés en nombre de CFU moyen par ml de sang. D'autre part l'état physiologique des animaux est enregistré pendant les 5 jours qui suivent l'épreuve bactérienne.

20 Les résultats peuvent être résumés de la façon suivante:

25 Dans les souris non-transgéniques et non traitées à la Fe-Tf, on mesure une bactériémie transitoire inférieure au nombre de CFU injecté, qui régresse rapidement en fonction du temps. La bactériémie est non détectable ou très faible à partir de  $t=48$ h. Tous les animaux de ce groupe survivent et ne présentent aucun signe de maladie.

30 Les souris non-transgéniques traitées à la Fe-Tf (24mg/IP) présentent une bactériémie élevée très tôt après l'épreuve bactérienne (dès  $t=4$ h) qui s'accroît encore au cours du temps. L'infection entraîne généralement la mort des animaux en moins de 48h.

35 Les souris transgéniques (concentration plasmatique en hTf environ 0,5 mg/ml) présentent une bactériémie élevée avec un maximum à  $t=24$ h. Les animaux sont

malades et la plupart se rétablissent progressivement alors que dans quelques cas, l'infection entraîne la mort par septicémie.

- 22 -

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: TRANSGENE
- (B) RUE: 11 rue de Molsheim
- (C) VILLE: STRASBOURG
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 88.27.91.00
- (H) TELECOPIE: (33) 88.22.58.07

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Animal transgenique exprimant une transferrine d'origine humaine.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:

NUMERO DE DEPOT: FR 93 06105

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

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 698 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (B) SOUCHE: Transferrine

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

```

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu
 1           5           10
Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
          20           25           30
His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
          35           40           45
Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
 50           55           60

```

- 23 -

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu  
 85 90 95  
 Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr  
 100 105 110  
 Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met  
 115 120 125  
 Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser  
 130 135 140  
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser  
 165 170 175  
 Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu  
 180 185 190  
 Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser  
 195 200 205  
 Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val  
 210 215 220  
 Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala  
 260 265 270  
 Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln  
 275 280 285  
 Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe  
 290 295 300  
 Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr  
 325 330 335  
 Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu  
 340 345 350  
 Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His  
 355 360 365  
 His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys  
 370 375 380

- 24 -

Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile  
 385 390 395 400

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr  
 405 410 415

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn  
 420 425 430

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val  
 435 440 445

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys  
 450 455 460

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn  
 465 470 475 480

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp  
 485 490 495

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser  
 500 505 510

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn  
 515 520 525

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val  
 530 535 540

Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn  
 545 550 555 560

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys  
 565 570 575

Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu  
 580 585 590

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr  
 595 600 605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln  
 610 615 620

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu  
 625 630 635 640

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys  
 645 650 655

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu  
 660 665 670

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser  
 675 680 685

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro  
 690 695

- 25 -

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

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: oligonucleotide de synthese OTG3320

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

GGGAAAAGAT CTCGGAAGAT GAGGCTCGCC GTG

33

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

## (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: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3321

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

CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATG

25

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

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 69 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- 26 -

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3336

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

AGCTTCATAT GAAAAGCGTC ATTCCATCCG ATGGTCCCAG TGTGCTTGT GTGAAGAAAG 60  
 CCTCCTACC 69

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 69 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3337

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

TTGATTGCAT CAGGGCCATT GCGGCAAACG AAGCGGATGC TGTGACTG GATGCAGTT 60  
 TGGTGTATG 69

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 62 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3338

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

ATGCTTACTT GGCTCCCAAT AACCTGAAGC CTGTGGTGGC AGAGTTCTAT GGGTCAAAG 60  
 AG 62

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 27 -

- (A) LONGUEUR: 75 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3339

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GATCCTCTTT TGACCCATAG AACTCTGCCA CCACAGGCTT CAGGTTATTG GGAGCCAAGT 60

AAGCATCATA CACCA 75

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 68 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3340

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AACCTGCATC CAGTGTACA GCATCCGCTT CGTTTGCCGC AATGGCCCTG ATGCAATCAA 60

GGTAGGAG 68

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 57 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- 28 -

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3341

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GCTTTCTTCA CACAAGCAAC ACTGGGACCA TCGGATGGAA TGACGCTTTT CATATGA

57

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 56 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3343

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GGGAAAGGAT CCACAGACTT TCTATTATGC TGTTGCTGTG GTGAAGAAGG ATAGTG

56

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese OTG3344

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TAGTTGGAAT TCTTTTGATT TGTCTTTGCC

30

### Revendications

1. Un animal transgénique dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour une transferrine d'origine humaine, en particulier un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.
2. Un animal transgénique selon la revendication 1, dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression ; lesdits éléments comprenant une région promotrice foie-spécifique.
3. Un animal transgénique selon la revendication 2, dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression ; lesdits éléments comprenant une région promotrice foie-spécifique qui est celle du gène murin de la transferrine.
4. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 3, dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, ledit fragment d'ADN étant de type minigène.
5. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 4, dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine ; ledit précurseur comprenant le peptide signal codé par le gène humain de la transferrine.
6. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 5, dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un précurseur de la transferrine humaine ; ladite transferrine ayant la séquence d'acides aminés telle que montrée dans l'identificateur de séquence n° 1, du résidu Val en position 20 au résidu Pro en position 698.

7. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 6, dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un précurseur de la transferrine humaine ; ledit précurseur ayant la séquence d'acides aminés telle que montrée dans l'identificateur de séquence n° 1, du résidu Met en position 1 au résidu Pro en position 698.
8. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 7, dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, à l'extérieur du gène homologue codant pour la transferrine.
9. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 8, qui est de type rongeur.
10. Une souris transgénique selon la revendication 9.
11. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 10, qui est simple transgénique pour le fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine.
12. Un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 10, qui est double transgénique pour le fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine.
13. Un procédé de préparation d'un animal simple transgénique selon la revendication 11, selon lequel :
  - on introduit dans un embryon non-humain, un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine, pour obtenir un embryon transgénique,
  - on transplante ledit embryon transgénique dans un animal femelle pseudo-gestante,
  - on permet audit embryon transgénique de se développer jusqu'à son terme, et

- 31 -

- on sélectionne au moins un animal simple transgénique dans le génome duquel est inséré un allèle dudit fragment d'ADN.
14. Un procédé d'obtention d'un animal double transgénique selon la revendication 12, selon lequel :
- on croise un animal mâle simple transgénique et un animal femelle simple transgénique, chacun obtenu par le procédé selon la revendication 13, et
  - on sélectionne au moins un descendant double transgénique dans le génome duquel sont intégrés deux allèles du fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une transferrine d'origine humaine.
15. Usage d'un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 12, à titre de modèle animal pour évaluer ou sélectionner un médicament potentiel destiné à la prévention ou au traitement d'une infection induite par un organisme pathogène possédant un récepteur capable de fixer une transferrine d'origine humaine.
16. Usage d'un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 12, à titre de modèle animal pour évaluer ou sélectionner un médicament potentiel destiné à la prévention ou au traitement d'une infection induite par un organisme pathogène sélectionné parmi les bactéries pathogènes *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* et *Bordetella pertussis* et les protozoaires pathogènes des genres *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* et *Plasmodium*.
17. Usage d'un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 12, à titre de modèle animal pour évaluer ou sélectionner un médicament potentiel destiné à la prévention ou au traitement d'une infection induite par *Neisseria meningitidis*.

18. Un procédé pour évaluer ou sélectionner un médicament potentiel destiné à la prévention ou au traitement d'une infection induite par un organisme pathogène possédant un récepteur capable de fixer une transferrine d'origine humaine, selon lequel :
- a) on administre ledit médicament à un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 12, avant pendant ou après l'administration d'une quantité déterminée dudit organisme pathogène audit animal transgénique, et
  - b) on suit l'évolution de l'infection pendant une période d'au moins 24 h après l'étape a), puis on évalue l'activité pour sélectionner le médicament donnant les meilleurs résultats.
19. Un procédé selon la revendication 18, selon lequel on administre à un animal transgénique selon l'une des revendications 1 à 12 une quantité d'au plus 6 mg de transferrine humaine chargée en fer, préalablement ou de façon concomitante à l'étape d'épreuve a).
20. Médicament obtenu par la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 18 ou 19.

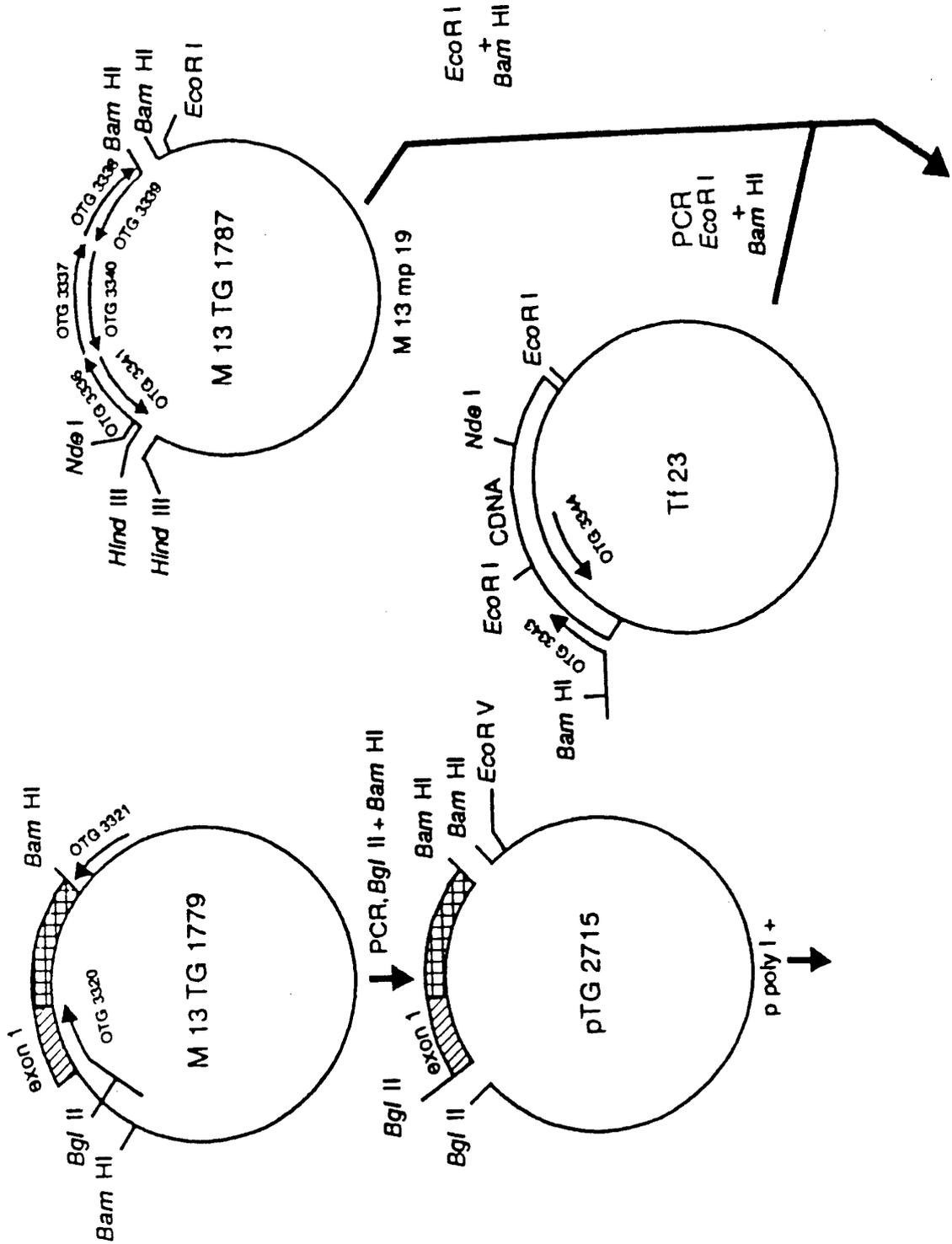


FIGURE 1 A

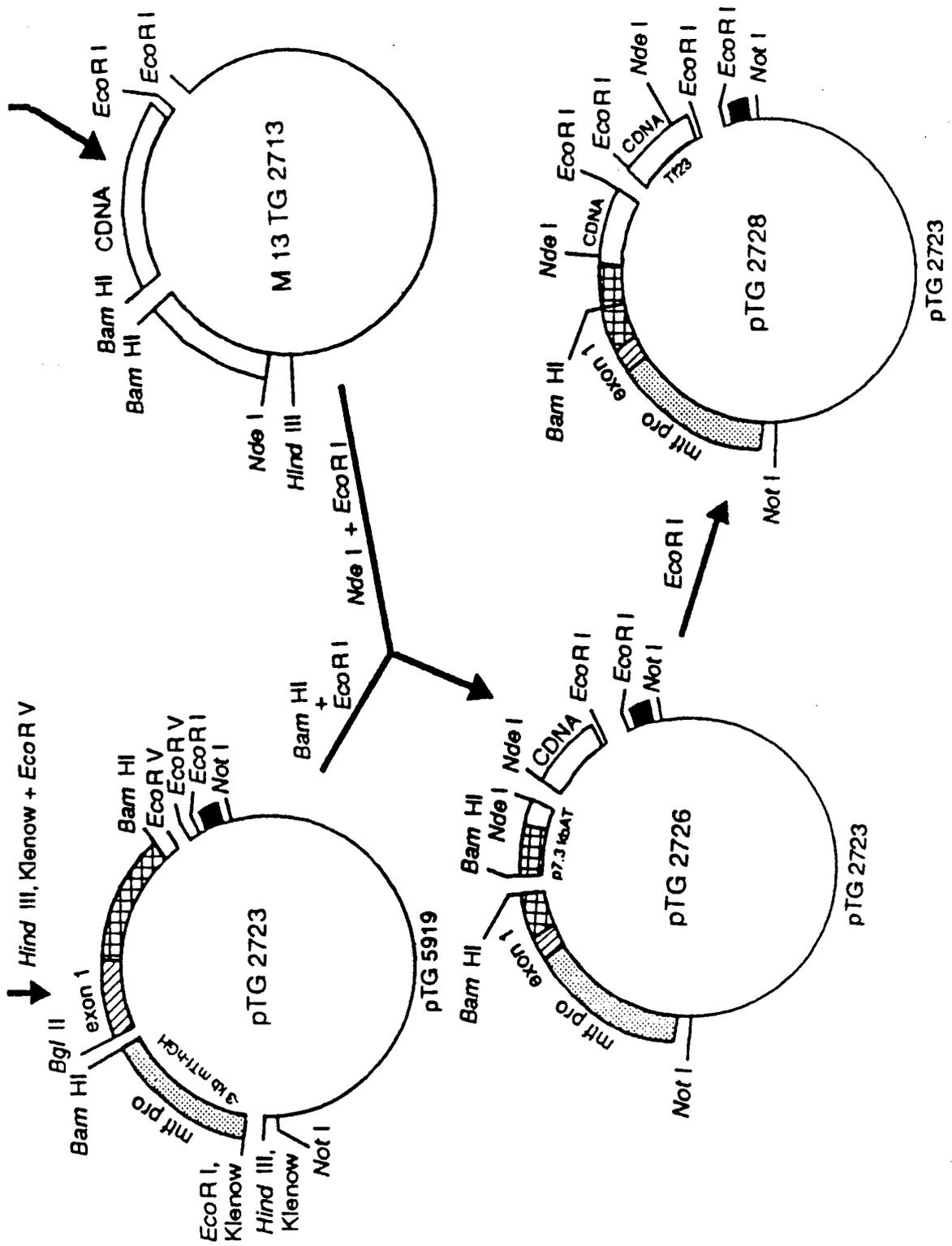


FIGURE 1 B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 94/00594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 C12N15/00 A01K67/027 C12N15/12 C07K13/00 G01N33/50  
A61K49/00 A61K31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 A01K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEVELOPMENTAL BIOLOGY vol. 155, no. 2 , February 1993 pages 452 - 458 LU, Y. ET AL. 'Expression of a chimeric human transferrin-chloramphenicol acetyl-transferase genes in liver and brain of transgenic mice during development' see the whole document ----	1
A	WO,A,92 13550 (UNIV. BRITISH COLUMBIA, UNIV. VERMONT & STATE AGRIC. COLLEGE) 20 August 1992 see the whole document ---	1
A	US,A,5 026 651 (BOWMAN, B.H. & YANG F.) 25 June 1991 see the whole document -----	1

Further documents are listed in the continuation of box C.  Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 August 1994

Date of mailing of the international search report  
( 23. 08. 94 )

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer  
Chambonnet, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/TR 94/00594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9213550	20-08-92	NONE	
US-A-5026651	25-06-91	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 94/00594

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 5	C12N15/00	A01K67/027	C12N15/12	C07K13/00	G01N33/50
	A61K49/00	A61K31/00			

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 A01K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DEVELOPMENTAL BIOLOGY vol. 155, no. 2 , Février 1993 pages 452 - 458 LU, Y. ET AL. 'Expression of a chimeric human transferrin-chloramphenicol acetyl-transferase genes in liver and brain of transgenic mice during development' voir le document en entier ----	1
A	WO,A,92 13550 (UNIV. BRITISH COLUMBIA, UNIV. VERMONT & STATE AGRIC. COLLEGE) 20 Août 1992 voir le document en entier ----	1
A	US,A,5 026 651 (BOWMAN, B.H. & YANG F.) 25 Juin 1991 voir le document en entier -----	1

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 Août 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

(23.08.94)

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

**PCT/FR 94/00594**

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9213550	20-08-92	AUCUN	
US-A-5026651	25-06-91	AUCUN	