



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

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, C07K 13/00, 15/00 C12N 15/00, C12P 21/08 G01N 33/50, A01K 67/027	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/12246 (43) Date de publication internationale: 23 juillet 1992 (23.07.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00023 (22) Date de dépôt international: 14 janvier 1992 (14.01.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/00320 14 janvier 1991 (14.01.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : NAHMIAS, Clara [FR/FR]; 15, rue de Sévigné, F-75004 Paris (FR). ÉMORINE, Laurent, Jean [FR/FR]; 39, rue de Domrémy, F-75013 Paris (FR). STROSBURG, Arthur, Donny [BE/FR]; 15, rue de Javel, F-75015 Paris (FR).		(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: NUCLEOTIDIC SEQUENCES CODING FOR THE MURINE ADRENERGIC BETA 3 RECEIVER AND APPLICATIONS THEREOF (54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LE RECEPTEUR BETA 3 ADRENERGIQUE MURIN ET LEURS APPLICATIONS (57) Abstract Nucleotidic sequences coding for the murine adrenergic-β3 receiver (RAβ3), utilization of said sequences as probes and for the expression of peptides and/or fragments thereof having an activity of murine RAβ3, vectors useful for said expression, as well as cellular hosts containing said vector. Polyclonal and monoclonal antibodies raised against said peptides and usable, particularly for the detection of murine adrenergic-β3 receivers, as well as method for screening substances, with agonist or antagonist action in relation to peptides having an adrenergic-β3 receiver activity and kits for the detection of the affinity degrees of different substances for said peptides having an adrenergic-β3 receiver activity. Transgenic and recombinant mice containing said nucleotidic sequence. (57) Abrégé Séquences nucléotidiques codant pour le récepteur β3-adrénérrique (RAβ3) murin, utilisation desdites séquences comme sondes et pour l'expression de peptides et/ou de fragments de ceux-ci ayant une activité de RAβ3 murin, vecteurs utiles pour ladite expression, ainsi que les hôtes cellulaires contenant ledit vecteur. Anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre lesdits peptides et utilisables, notamment pour la détection de récepteurs β3-adrénérriques murins, ainsi qu'un procédé de criblage de substances, à action agoniste ou antagoniste vis-à-vis des peptides ayant une action de récepteur β3-adrénérrique et des trousseaux ou kits pour la détection du degré d'affinité de différentes substances pour lesdits peptides à activité de récepteur β3-adrénérrique. Souris transgéniques et recombinantes contenant ladite séquence nucléotidique.		

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	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	MI	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brsil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CH	Suisse			SE	Suède
CI	Côte d'Ivoire	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CS	Tchecoslovaquie	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
DE	Allemagne	LU	Luxembourg	TG	Togo
DK	Danemark	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LE RECEPTEUR BETA 3 ADRENERGIQUE MURIN ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à des séquences nucléotidiques codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique ($RA\beta 3$) murin, à l'utilisation desdites
10 séquences comme sondes et pour l'expression de peptides et/ou de fragments de ceux-ci ayant une activité de $RA\beta 3$ murin, aux vecteurs utiles pour ladite expression, ainsi qu'aux hôtes cellulaires contenant ledit vecteur.

15 La présente invention est également relative à des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre lesdits peptides et utilisables, notamment pour la détection de récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques murins, ainsi qu'à un procédé de criblage de substances, à action agoniste ou
20 antagoniste vis-à-vis des peptides ayant une action de récepteur $\beta 3$ -adrénergique et à des troussees ou kits pour la détection du degré d'affinité de différentes substances pour lesdits peptides à activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique. De telles substances sont notamment uti-
25 lisables comme médicaments, dans le traitement de l'obésité, du diabète gras et du diabète des sujets non insulino-dépendants ainsi que dans le traitement des hyperlipidémies.

Il est connu que les catécholamines telles que
30 l'adrénaline et la noradrénaline, les agonistes synthétiques de ces catécholamines, qui miment leurs fonctions biologiques et les antagonistes, qui bloquent ces fonctions biologiques, exercent leurs effets en se liant à des sites de reconnaissance (récepteurs membranaires)
35 spécifiques, situés sur les membranes cellulaires.

Deux classes principales de récepteurs adrénergiques ont été définies, les récepteurs adrénergiques α et les récepteurs adrénergiques β .

Dans l'ensemble de ces deux classes, on distingue, maintenant, cinq sous-types de récepteurs aux catécholamines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ -RA). Leurs gènes ont été récemment isolés et identifiés (S. COTECCHIA et al.,
5 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7159-7163 ; B.K. KOBILKA et al., 1987, Science, 238, 650-656 ; T. FRIELLE et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7920-7924 ; L.J. EMORINE et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 6995-6999 ; L.J. EMORINE et al., 1989,
10 Science, 245, 1118-1121). L'analyse de ces gènes a permis de reconnaître leur appartenance à une famille de récepteurs membranaires intégraux présentant certaines homologues (R.A.F. DIXON et al., 1998, Annual Reports in Medicinal Chemistry, 221-233 ; L.J. EMORINE et al., 1988,
15 Proc. NATO Adv. Res. Workshop), notamment au niveau de 7 régions transmembranaires, qui sont couplées à des protéines régulatrices, appelées protéines G, susceptibles de fixer des molécules de guanosine triphosphate (GTP).

Ces récepteurs membranaires, lorsqu'ils ont
20 fixé le ligand approprié (agoniste ou antagoniste), subissent un changement de conformation, qui induit un signal intracellulaire, qui modifie le comportement de la cellule cible.

Dans le cas des récepteurs β -adrénergiques,
25 lorsqu'ils se lient avec des agonistes des catécholamines, ils catalysent l'activation d'une classe de protéines G, qui stimule à son tour l'activité de l'adénylate cyclase, alors que les antagonistes des RA β agissent en compétition avec les agonistes pour la liaison au récepteur et empêchent l'activation de l'adénylate
30 cyclase.

Lorsque l'adénylate cyclase est activée, elle catalyse la production d'un médiateur intracellulaire ou second messenger, notamment l'AMP cyclique.

35 Les Inventeurs ont récemment mis en évidence de nouveaux récepteurs β -adrénergique chez l'Homme,

dénommés RA-Hu β 3, et caractérisés par des propriétés différentes de celles des récepteurs β 1 et β 2, notamment en ce qu'ils se comportent de façon différente vis-à-vis de substances respectivement antagonistes et agonistes des récepteurs β 1 et β 2 (Demande de Brevet français n° 89 00918).

Un tel récepteur RA-Hu β 3 est plus particulièrement constitué par une séquence de 402 amino-acides et est considéré comme comportant également sept régions transmembranaires hydrophobes séparées par des boucles hydrophiles intra- et extra-cellulaires.

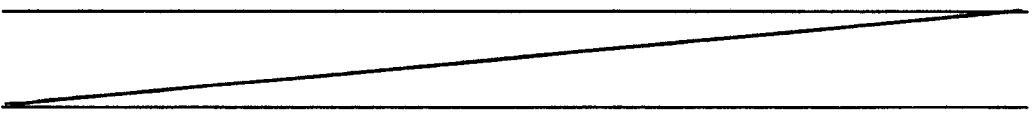
Poursuivant leurs travaux dans cette voie, les Inventeurs, ont cherché à mettre en évidence un tel RA β 3 chez les rongeurs et plus particulièrement chez les murins afin de pouvoir disposer notamment d'un modèle d'étude des ligands β -adrénergiques.

La présente invention a pour objet une séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène murin codant pour un peptide ayant une activité de récepteur β 3-adrénergique, c'est-à-dire qu'il est capable de participer à l'activation de l'adénylate cyclase en présence d'au moins un des agonistes suivants : BRL 28410, BRL 37344, CGP 12177A et (1)-isoprotérénol.

L'agoniste CGP 12177A est notamment décrit dans l'article au nom de N. MOHELL et al. (Biochem. J., 1989, 261, 401-405) et les agonistes BRL 28410 et BRL 37344 sont décrits dans l'article au nom de J.R.S. ARCH et al. (Nature, 1984, 309, 5964, 163-165).

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite séquence, celle-ci comporte 1920 paires de bases et comprend la séquence en nucléotides de formule I ci-après :

35



	GATCTGTAATCCCAGCACTGGGGAGGTTGAGGCAGAAGGATCTGGAGGTCCAGACCAATC	60
	TGGGCAACATATAGAAAGACTATCTCAAACAATAAGATACCTTAGGGAGAGCATCCAAGC	120
	AGAAGAGGGGCTATCTTGGATGGTTTGGGTTGTTTCGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTCTGGA	180
	TGGTTGCCTTCCTTGGTTGGGTAAAGGATAGGGTGCGGGGGTTTCTCTTCTTTCAGGGTT	240
	GCCTCAGGTTCTGCCAGGAAGGAGCTGCTGAGCTCCAGGAAACCGGTGCTGAGGGAGTGT	300
5	CAAGACAGGACGCCCCCTCTCCACCCTCCAATTCCCACCAGAGGCCTCTCTTGTGACTATT	360
	GGACGCTGTTTCCTTTAAAGCAGCCACTCCTCCCGGCAACTAGGGTGTACATGGGGGGTG	420
	AGATGGAGGGAAGCTGACAGACTTACCCAGCAATTAGGGAAGATGGCCAGGCTGGAAG	480
	AGTCGCTCCCAAGCCCTACTGTCCCCTTCCCTAAGCCAGCGGGTCTGGGGAGGAGGGGA	540
	ACCTTCCACCCAGGCGCCACACGAG ATG GCT CCG TGG CCT CAC AGA AAC	591
10	GGC TCT CTG GCT TTG TGG TCG GAC GCC CCT ACC CTG GAC CCC AGT	636
	GCA GCC AAC ACC AGT GGG TTG CCA GGA GTA CCA TGG GCA GCG GCA	681
	TTG GCT GGG GCA TTG CTG GCG CTG GCC ACG GTG GGA GGC AAC CTG	726
	CTG GTA ATC ATA GCC ATC GCC CGC ACG CCG AGA CTA CAG ACC ATA	771
	ACC AAC GTG TTC GTG ACT TCA CTG GCC GCA GCT GAC TTG GTA GTG	816
15	GGA CTC CTC GTA ATG CCA CCA GGG GCC ACA TTG GCG CTG ACT GGC	861
	CAT TGG CCC TTG GGC GAA ACT GGT TGC GAA CTG TGG ACG TCA GTG	906
	GAC GTG CTC TGT GTA ACT GCT AGC ATC GAG ACC TTG TGC GCC CTG	951
	GCT GTG GAC CGC TAC CTA GCT GTC ACC AAC CCT TTG CGT TAC GGC	996
	ACG CTG GTT ACC AAG CGC CGC GCC CGC GCG GCA GTT GTC CTG GTG	1041
	TGG ATC GTG TCC GCT GCC GTG TCC TTT GCG CCC ATC ATG AGC CAG	1086
20	TGG TGG CGT GTA GGG GCA GAT GCC GAG GCA CAG GAA TGC CAC TCC	1131
	AAT CCG CGC TGC TGT TCC TTT GCC TCC AAC ATG CCC TAT GCG CTG	1176
	CTC TCC TCC TCC GTC TCC TTC TAC CTT CCC CTC CTT GTG ATG CTC	1221
	TTC GTC TAT GCT CGA GTG TTC GTT GTG GCT AAG CGC CAA CGG CAT	1266
	TTG CTG CGC CGG GAA CTG GGC CGC TTC TCG CCC GAG GAG TCT CCG	1311
25	CCG TCT CCG TCG CGC TCT CCG TCC CCT GCC ACA GGC GGG ACA CCC	1356
	GCG GCA CCG GAT GGA GTG CCC CCC TGC GGC CGG CGG CCT GCG CGC	1401
	CTC CTG CCA CTC CGG GAA CAC CGC GCC CTG CGC ACC TTA GGT CTC	1446
	ATT ATG GGC ATC TTC TCT CTG TGC TGG CTG CCC TTC TTC CTG GCC	1491
	AAC GTG CTG CGC GCA CTC GCG GGG CCC TCT CTA GTT CCC AGC GGA	1536
30	GTT TTC ATC GCC CTG AAC TGG CTG GGC TAT GCC AAC TCC GCC TTC	1581
	AAC CCG GTC ATC TAC TGC CGC AGC CCG GAC TTT CGC GAC GCC TTC	1626
	CGT CGT CTT CTG TGT AGC TAC GGT GGC CGT GGA CCG GAG GAG CCA	1671
	CGC GCA GTC ACC TTC CCA GCC AGC CCT GTT GAA GCC AGG CAG AGT	1716
	CCA CCG CTC AAC AGG TAG GGGACACGAGCGGGGGACCGGAGTCTCTGGGTGGGG	1770
	ACGTCTCTGTCTCTATTTTTGAGTTTGGAGATTGGGGGAGGGGAAGATGTAGATGGGGGT	1830
35	GCGGTGTGTGTGTGGGTGGGGGGTGGCCTTTGTCTTGAGAGGACAGAAAAGAGGTAGGAA	1890
	CTAAAACGGGCCCTTTCTCTTCTTGGATCC	1920

(I)

ainsi que les séquences dérivées de celle-ci et les fragments de ladite séquence et des séquences dérivées.

Ladite séquence comprend notamment les sites de restriction uniques suivants :

- 5 AlwN I, Sac I, Stu I, Dra I, Mse I, Bbe I, Nar I, Xcm I, NCo I, BspM I, Afl III, Pvu I, Nhe I, BstE II, BspH I, Bsm I, Nsp7524 I, NspH I, Xho I, Sac II, Eag I, Nae I, PaeR7 I, EcoN I, Fsp I, Bbv II, Nru I, Drd I, BamH I.

L'invention a également pour objet les fragments de ladite séquence utiles pour l'expression du peptide correspondant et/ou la détection du gène murin codant pour le récepteur $\beta 3$ murin.

Parmi lesdits fragments, elle englobe entre autres :

15 - une séquence constituée d'un segment de 1164 paires de bases nucléotidiques, qui correspond aux nucléotides 568-1731 de la séquence de formule I.

- une séquence constituée d'un segment de 1360 paires de bases contenant la région codante du gène $\beta 3$ murin et une partie de la région 3' non traduite.

20 - une séquence constituée d'un segment de 280 paires de bases nucléotidiques, qui correspond aux nucléotides 1640-1920 de la séquence de formule I.

- une séquence constituée d'un segment de 608 paires de bases nucléotidiques, situé entre les régions transmembranaires TM3 et TM6 et qui correspond aux nucléotides 895-1503 de la séquence de formule I.

25 - une séquence constituée d'un segment de 297 paires de bases nucléotidiques, allant du codon d'initiation de la traduction jusqu'à la fin du domaine TM2 et qui correspond aux nucléotides 567-864 (région du gène codant pour la partie amino-terminale du peptide) de la séquence de formule I.

Font également partie de l'invention, les acides nucléiques variants par rapport à ceux ci-dessus définis et qui comportent certaines mutations localisées

dans la mesure où ces acides nucléiques variants s'hybrident avec les acides nucléiques précédemment définis ou avec des fragments de ceux-ci.

On entend, au sens de la présente invention, par séquence dérivée, aussi bien une séquence d'ADN ou d'ARN simple-brin ou double-brin, que leurs séquences complémentaires.

La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles s'hybrident avec les séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus mais ne s'hybrident pas avec les gènes codant pour les récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, ni avec l'ARN messager desdits récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, et en ce qu'elles sont éventuellement marquées à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou toute autre substance non radioactive appropriée.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite sonde, sa séquence est homologue ou complémentaire de celle d'un segment d'au moins 10 pb de la séquence I.

Au sens de la présente invention, "séquence homologue" englobe non seulement les séquences identiques à la séquence I, ou à un fragment de celle-ci, mais également celles n'en différant que par la substitution, la délétion ou l'addition d'un petit nombre de nucléotides, à condition que les séquences ainsi modifiées aient une spécificité d'hybridation équivalente à celle de la séquence (I) ou du segment considéré.

De même, on entend par "séquence complémentaire", non seulement les séquences strictement complémentaires de la séquence (I) ou de ses segments, mais également des séquences modifiées, comme indiqué précédemment, possédant une spécificité d'hybridation équivalente à celle desdites séquences strictement complémentaires.

Les conditions d'hybridation sont définies comme suit :

Pour les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont les suivantes :

750 mM de NaCl, 75 mM de Tri-sodium citrate, 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon, 50 mM de phosphate de sodium, 1 mM de pyrophosphate de sodium, 100 µM d'ATP, 10 à 25 % de formamide, 1 % Ficoll ("PHARMACIA" poids moléculaire moyen de 400,00), 1 % de polyvinylpyrrolidone, 1 % de sérum albumine bovine, pendant 14 à 16 h à 42°C.

Pour les sondes les plus longues, c'est-à-dire présentant plus d'environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont celles indiquées précédemment pour les sondes les plus courtes, mais dans lesquelles le milieu sus-défini contient 40 % de formamide au lieu de 10 à 25 % de formamide.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite sonde peut être avantageusement définie par l'une quelconque des séquences nucléotidiques définies ci-dessus et notamment :

- le fragment de 1920 paires de base, qui correspond à la totalité de la séquence de formule I

- le fragment d'environ 600 pb, qui correspond au fragment situé entre les régions transmembranaires TM3 et TM6 de la séquence de formule I ci-dessus ;

- le fragment d'environ 300 pb qui correspond à la région du gène codant pour la partie amino-terminale du peptide, allant du codon d'initiation de la traduction jusqu'à la fin du domaine TM2.

- le fragment d'environ 280 paires de bases qui correspond au segment 1640-1920 de la séquence de formule I.

De telles sondes ont notamment l'avantage de permettre la caractérisation des lignées consanguines

génétiqnement définies de souris diabétiques et/ou obèses, notamment des lignées db/db, ob/ob, NOD.

La présente invention a également pour objet un peptide et/ou un fragment de peptide, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus et en ce qu'il présente une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique.

Une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique est celle définie dans la Demande de Brevet français n° 89 00918, à savoir que, lorsque le fragment est exposé à la surface d'une cellule, il est capable de participer à l'activation de l'adénylate cyclase en présence d'un des agonistes suivants : BRL 28410, BRL 37344, CGP 12177A et (1)-isoprotérénol ; soit il est susceptible d'être reconnu par des anticorps qui ne reconnaissent ni le récepteur adrénérqique $\beta 1$, ni le récepteur adrénérqique $\beta 2$; soit il est susceptible de générer des anticorps qui ne reconnaissent ni le récepteur $\beta 1$, ni le récepteur $\beta 2$.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit peptide, il comprend 388 amino-acides et présente la séquence en amino-acides de formule II suivante :

Mét-Ala-Pro-Trp-Pro-His-Arg-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Leu-Trp-Ser-Asp-Ala-Pro-Thr-Leu-Asp-Pro-Ser-Ala-Ala-Asn-Thr-Ser-Gly-Leu-Pro-Gly-Val-Pro-Trp-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala-Gly-Ala-Leu-Leu-Ala-Leu-Ala-Thr-Val-Gly-Gly-Asn-Leu-Leu-Val-Ile-Ile-Ala-Ile-Ala-Arg-Thr-Pro-Arg-Leu-Gln-Thr-Ile-Thr-Asn-Val-Phe-Val-Thr-Ser-Leu-Ala-Ala-Ala-Asp-Leu-Val-Val-Gly-Leu-Leu-Val-Met-Pro-Pro-Gly-Ala-Thr-Leu-Ala-Leu-Thr-Gly-His-Trp-Pro-Leu-Gly-Glu-Thr-Gly-Cys-Glu-Leu-Trp-Thr-Ser-Val-Asp-Val-Leu-Cys-Val-Thr-Ala-Ser-Ile-Glu-Thr-Leu-Cys-Ala-Leu-Ala-Val-Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Val-Thr-Asn-Pro-Leu-Arg-Tyr-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Lys-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-Ala-Val-Val-Leu-Val-Trp-Ile-Val-Ser-Ala-Ala-Val-Ser-Phe-Ala-Pro-Ile-Met-Ser-Gln-Trp-Trp-Arg-Val-Gly-Ala-Asp-Ala-Glu-Ala-Gln-Glu-Cys-His-Ser-Asn-Pro-Arg-Cys-Cys-Ser-Phe-Ala-

Ser-Asn-Met-Pro-Tyr-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Ser-Val-Ser-Phe-
Tyr-Leu-Pro-Leu-Leu-Val-Met-Leu-Phe-Val-Tyr-Ala-Arg-Val-
Phe-Val-Val-Ala-Lys-Arg-Gln-Arg-His-Leu-Leu-Arg-Arg-Glu-
Leu-Gly-Arg-Phe-Ser-Pro-Glu-Glu-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Ser-
5 Arg-Ser-Pro-Ser-Pro-Ala-Thr-Gly-Gly-Thr-Pro-Ala-Ala-Pro-
Asp-Gly-Val-Pro-Pro-Cys-Gly-Arg-Arg-Pro-Ala-Arg-Leu-Leu-
Pro-Leu-Arg-Glu-His-Arg-Ala-Leu-Arg-Thr-Leu-Gly-Leu-Ile-
Met-Gly-Ile-Phe-Ser-Leu-Cys-Trp-Leu-Pro-Phe-Phe-Leu-Ala-
Asn-Val-Leu-Arg-Ala-Leu-Ala-Gly-Pro-Ser-Leu-Val-Pro-Ser-
10 Gly-Val-Phe-Ile-Ala-Leu-Asn-Trp-Leu-Gly-Tyr-Ala-Asn-Ser-
Ala-Phe-Asn-Pro-Val-Ile-Tyr-Cys-Arg-Ser-Pro-Asp-Phe-Arg-
Asp-Ala-Phe-Arg-Arg-Leu-Leu-Cys-Ser-Tyr-Gly-Gly-Arg-Gly-
Pro-Glu-Glu-Pro-Arg-Ala-Val-Thr-Phe-Pro-Ala-Ser-Pro-Val-
Glu-Ala-Arg-Gln-Ser-Pro-Pro-Leu-Asn-Arg (II),
15 lequel peptide présente 82 % d'homologie avec le peptide
 $\beta 3$ humain (récepteur $\beta 3$ humain).

Ce peptide est dénommé ci-après récepteur $\beta 3$ -adrénergique murin (RA-Mu $\beta 3$).

Il n'était pas évident que les murins possédassent un récepteur $\beta 3$ -adrénergique et que ce dernier soit, de plus, suffisamment homologue au récepteur $\beta 3$ -adrénergique humain, pour permettre son utilisation comme modèle d'étude générale du récepteur $\beta 3$ -adrénergique.

Le RA- $\beta 3$ murin (RA-Mu $\beta 3$) présente, en effet,
25 un certain nombre d'avantages :

- il est particulièrement bien adapté en tant que modèle du récepteur $\beta 3$ -adrénergique, en particulier pour des études physiologiques, qui ne peuvent pas être réalisées avec le récepteur humain ;
- 30 - il permet d'étudier la régulation de l'expression du récepteur $\beta 3$ -adrénergique, dans différentes conditions physiologiques (exposition au froid ou à des ligands β -adrénergiques), qui peuvent modifier l'activité lipolytique et/ou thermogénique, car le récepteur $\beta 3$ -adrénergique intervient dans les maladies telles que le diabète et/ou l'obésité, dans la mesure où il est
- 35

exprimé dans des tissus qui jouent un rôle important dans le métabolisme (tissus adipeux, muscle squelettique notamment) ;

- il permet en outre d'analyser l'expression
5 du récepteur β_3 -adrénergique au cours du développement embryonnaire.

L'invention comprend également les peptides variants de ceux définis ci-dessus, qui comportent certaines mutations, sans que les peptides ne perdent les
10 propriétés de récepteur β_3 -adrénergique. Parmi ces variants, on peut mentionner ceux qui sont reconnus par des anticorps reconnaissant les régions transmembranaires, ainsi que ceux qui sont reconnus par des anticorps reconnaissant les régions autres que les régions
15 transmembranaires.

La présente invention a également pour objet des fragments ou des combinaisons de fragments du RA-Mu β_3 , conforme à l'invention et notamment :

- un fragment de 25 amino-acides, correspondant à la région transmembranaire TMI de la séquence de
20 formule II ;

- un fragment de 30 aminoacides, correspondant au fragment COOH terminal de la séquence de formule II.

Lesdits fragments sont avantageusement obtenus
25 par synthèse, notamment par la méthode de Merrifield.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

30 On entend au sens de la présente invention, par vecteur recombinant, aussi bien un plasmide, un cosmide qu'un phage.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, il est constitué par un vecteur recombinant approprié comprenant en particulier une origine de réplique
35 dans un microorganisme hôte approprié, notamment

une bactérie ou une cellule eucaryote, au moins un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des cellules eucaryotes ayant reçu ledit vecteur, une séquence régulatrice appropriée, notamment un promoteur permettant l'expression des gènes dans lesdites bactéries ou cellules eucaryotes, et dans lequel est insérée une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence tels que définis ci-dessus, lequel vecteur est un vecteur d'expression d'un peptide, d'un fragment de peptide ou d'une combinaison de fragments de peptides ayant une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique murin.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit vecteur d'expression est constitué successivement d'une origine de répllication approprié, d'un gène de résistance à l'ampicilline, du promoteur viral SV40, d'une séquence nucléotidique conforme à l'invention codant pour un peptide ayant une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique murin, d'un site de polyadénylation dérivé du virus de l'hépatite B (HBsAg) et du gène codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme qui permet la survie des cellules dans un milieu dépourvu en glycine, hypoxanthine et thymidine.

Un tel plasmide a été dénommé pSTH-Mo $\beta 3$ par les Inventeurs et a été déposé sous le n° I-1026 en date du 14 janvier 1991 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression conforme à l'invention.

Une telle cellule est capable d'exprimer un peptide, d'origine murine, ayant une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique.

Selon un mode de réalisation avantageux, la cellule hôte est notamment constituée par les cellules de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary).

Un autre des microorganismes utilisés peut être constitué par une bactérie, notamment *Escherichia coli*.

La présente invention a également pour objet un processus d'expression d'un peptide conforme à l'invention, caractérisé en ce que la cellule hôte, résultant de la transformation par un vecteur contenant une séquence nucléotidique ou un fragment de celle-ci, codant pour un peptide d'origine murine ayant une activité de récepteur β_3 -adrénergique ou un fragment de celui-ci, est cultivée de manière à produire et à transporter ledit peptide exprimé vers la membrane, de telle sorte que les séquences transmembranaires dudit récepteur β_3 soient exposées à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé.

Dans le cas de l'expression en cellules eucaryotes, les éléments de régulation peuvent comporter le promoteur endogène des récepteurs adrénérergiques ou des promoteurs viraux tels que ceux des virus SV40 ou du virus du sarcome de Roux (RSV).

Dans le cas de l'expression dans *E. coli*, les éléments de régulation peuvent comporter le promoteur de l'opéron lactose ou de l'opéron tryptophane.

La présente invention a également pour objet un modèle d'étude des récepteurs β_3 -adrénergiques, caractérisé en ce qu'il est constitué par des cellules hôtes conformes à l'invention, c'est-à-dire exprimant un récepteur β_3 -adrénergique murin à la surface de leur membrane cellulaire.

Un tel modèle permet l'étude, d'un point de vue pharmacologique, des récepteurs β_3 -adrénergiques murins, notamment en permettant l'identification des ligands β adrénérergiques plus affins pour le récepteur β_3 adrénérergique ou plus sélectifs par rapport aux récepteurs β_1 et β_2 et ainsi la mise au point des médicaments actifs dans des maladies telles que le diabète et/ou l'obésité.

L'invention a également pour objet un procédé de détection de la capacité d'une substance à se comporter comme ligand vis-à-vis d'un peptide conforme à l'invention, lequel procédé comprend :

5 - la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un vecteur d'expression conforme à l'invention, laquelle cellule hôte exprime ledit peptide murin (RA β 3 murin), le cas échéant après induction physique ou chimique appropriée, 10 et laquelle mise en contact est réalisée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins des sites spécifiques et ladite substance s'il y a lieu ; et

 - la détection de la formation éventuelle d'un 15 complexe du type ligand-peptide.

La présente invention a, de plus, pour objet une méthode de production de souris transgéniques surexprimant le récepteur β 3-adrénergique, laquelle méthode comprend l'introduction de plusieurs copies d'un segment 20 comprenant au moins la séquence de formule I associée à un promoteur convenable, dans les cellules d'un embryon de souris à un stade précoce.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ladite méthode, le promoteur est le promoteur du gène RA-Mu β 3, notamment de façon à respecter sa répartition 25 tissulaire d'origine.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux de ladite méthode, le promoteur est un promoteur d'un gène exprimé spécifiquement dans un tissu, notamment 30 le promoteur de l'actine musculaire.

La présente invention a, de plus, pour objet des souris transgéniques, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par la méthode de production de souris transgéniques telle que définie ci-dessus.

35 La présente invention a également pour objet une méthode de production de souris recombinantes,

n'exprimant plus le récepteur $\beta 3$ -adrénergique, caractérisée en ce que :

- l'on réalise, dans la séquence de formule I, conforme à l'invention, une mutation convenable qui 5 inhibe l'expression du gène codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique murin ;
- l'on introduit ladite séquence I modifiée dans un segment de l'ADN génomique de souris, associé à un marqueur approprié, de manière à obtenir une séquence 10 marquée M, contenant la séquence de formule I modifiée ;
- l'on intègre ladite séquence M, *in vitro*, dans les cellules souches de lignées germinales d'embryon de souris ; puis
- l'on réinjecte lesdites cellules souches à 15 une souris ; et après recombinaison homologue,
- l'on obtient à la génération F2 des souris recombinées homozygotes, reconnaissables à la présence du marqueur.

Un protocole de souris recombinantes est, par 20 exemple, décrit dans Nature, 1988, 336, 348-352.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ladite méthode, ledit segment d'ADN génomique de souris comprend au plus 14 Kbases.

Selon une disposition avantageuse de ce mode 25 de mise en oeuvre, lorsque ledit fragment est de 14 Kbases, il comprend notamment les sites de restriction suivants : 3 sites SphI, 2 sites BamHI, 2 sites HindIII, 4 sites XbaI, 4 sites SacI, 1 site KpnI, 1 site SmaI, 2 sites BglII, 2 sites PvuII, 1 site PstI et 1 site EcoRI.

30 Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux de ladite méthode, la séquence de formule I mutée est comprise entre un site BglII et un site BamHI du segment d'ADN génomique de souris.

La présente invention a, de plus, pour objet 35 des souris recombinantes, caractérisées en ce qu'elles

sont obtenues par la méthode de production de souris recombinantes telle que définie ci-dessus.

Les souris transgéniques et les souris recombinantes telles que définies ci-dessus, sont un modèle
5 d'étude particulièrement avantageux, d'un point de vue physiologique, des récepteurs β_3 -adrénergiques.

La présente invention a, en outre, pour objet un procédé pour l'étude de l'affinité d'un polypeptide conforme à l'invention pour un ou plusieurs ligands
10 déterminés, lequel procédé comprend :

- la transformation d'une cellule hôte appropriée par un vecteur d'expression conforme à l'invention ;

- la culture de la cellule hôte transformée,
15 dans des conditions permettant l'expression du récepteur β_3 codée par la séquence nucléotidique, et le transfert du récepteur β_3 exprimé vers la membrane de ladite cellule, de sorte que les séquences transmembranaires du récepteur β_3 soient exposées à la surface de la cellule
20 hôte transformée ;

- la mise en contact de ladite cellule avec les ligands déterminés ; et

- la détection d'une réaction affine entre ladite cellule transformée et lesdits ligands déterminés.

25 L'invention a, en outre, pour objet un kit pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour un peptide conforme à l'invention, lequel kit comprend :

- une culture de cellules hôtes transformées
30 par un vecteur d'expression conforme à l'invention ;

- éventuellement, si nécessaire, des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression d'un peptide (récepteur β_3 murin ou un fragment de celui-ci) codé par une séquence nucléotidique conforme à
35 l'invention, contenue dans un vecteur dont le promoteur est inductible ;

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour ledit peptide ; et

- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique du peptide exprimé.

L'invention a également pour objet des anticorps dirigés de façon spécifique contre l'un des peptides conformes à l'invention, ces anticorps étant tels qu'ils ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique $\beta 1$,
10 ni le récepteur adrénergique $\beta 2$.

Selon un mode de réalisation avantageux, lesdits anticorps sont des anticorps polyclonaux.

Selon un mode de réalisation avantageux, lesdits anticorps sont des anticorps monoclonaux.

15 On prépare les anticorps monoclonaux par fusion cellulaire entre des cellules de myélome et des cellules spléniques de souris immunisées, selon les procédés classiques.

De manière inattendue, le récepteur $\beta 3$ -adrénergique murin permet la réalisation de toutes les applications précitées.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se
25 réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, avec référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente la carte de restriction du clone MB1 qui contient le gène $\beta 3$ -adrénergique murin et comprend 14 Kb ;

- la figure 2 représente les sites uniques de restriction de la séquence de formule I (gène murin $\beta 3$) ;

- la figure 3 est une comparaison des régions codantes des gènes $\beta 3$ humain et murin ;

35 - la figure 4 est une comparaison des récepteurs $\beta 3$ humain et murin ;

- la figure 5 est une comparaison des récepteurs β_1 , β_2 et β_3 humains avec le récepteur β_3 murin ;

- la figure 6 représente la détection par autoradiographie de l'ADN génomique de souris, s'hybridant avec des sondes spécifiques du gène β_3 -adrénergique ;

- la figure 7 est une représentation du plasmide pSTH-Mu β_3 ;

- la figure 8 illustre la localisation du gène β_3 -adrénergique murin sur le chromosome 8 par hybridation *in situ* ;

- la figure 9 illustre la liaison à saturation de l' [125 I] ICYP aux cellules intactes CHO-Mu β_3 ;

- les figures 10 (10A, 10B et 10C) illustrent l'accumulation d'AMPC après exposition des cellules CHO-Mu β_3 aux agonistes β classiques (A), aux agonistes β atypiques (B) et aux antagonistes β (C), en présence de (-)isoprotérénol 5 nM ;

- la figure 11 représente l'hybridation en Northern Blot de la sonde A21 avec l'ARN total de différents tissus de souris.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Isolement et identification du gène β_3 -adrénergique murin.

Le gène β_3 murin a été isolé d'une banque d'ADN génomique de souris de la lignée NIH-3T3 construite dans le phage λ -FixII, en utilisant comme sonde un fragment d'ADN de 1034 pb (sonde Hu β_3) contenant la totalité du gène β_3 -adrénergique humain précédemment isolé (EMORINE et al., Science, 245, 1118-1121, 1989). Après hybridation avec la sonde radiomarkée, les filtres sont lavés, et exposés une nuit sur film d'autoradiographie. 24 signaux d'hybridation ont été observés, dont 18 se

sont par la suite révélés être de faux positifs. Les 6 clones restants (MB1, MB2, MB3, MB4, MB9, MB12) ont été purifiés par 4 sous-clonages successifs suivis d'une hybridation avec la sonde Hu β 3 (voir Demande française 5 89 00918).

Pour identifier le(s) clone(s) contenant le gène β 3-adrénergique murin, deux méthodes ont été utilisées : l'hybridation avec d'autres sondes β -adrénergiques, et l'amplification par PCR. L'ADN des 6 clones a 10 été préparé, coupé par des endonucléases de restriction, puis hybridé avec plusieurs sondes dérivées des gènes β -adrénergiques, comme visible sur le Tableau I ci-après.

TABLEAU I

15		Huβ3	Huβ1	SONDES Huβ2	i3β3	3'β1	i3β2
	Gène						
	β1 humain	++	+++	++	-	+	-
	β2 humain	+	++	+++	-	-	+
20	β3 humain	+++	++	+	+	-	-
	Clone						
	MB1	+++	+	-	+	-	-
	MB2	+++	+	-	+	-	-
	MB3	+++	+	-	+	-	-
	MB4	+++	+	-	+	-	-
25	MB9	+++	+	-	+	-	-
	MB12	+	-	-	-	-	-

Les sondes utilisées dérivent toutes des gènes β -adrénergiques humains, β 1, β 2 ou β 3, telles que décrites dans la Demande de Brevet français n° 89 00918.

30 Les sondes Hu β 1, Hu β 2 et Hu β 3 (environ 1,2 Kb) contiennent respectivement la totalité des régions codantes des gènes β 1, β 2 et β 3. Comme l'indique la partie supérieure du Tableau I, chacune des sondes hybride avec les trois gènes humains.

35 Les sondes 3' β 1, i3 β 2 et i3 β 3 (environ 200 à 300 pb) correspondent respectivement à la partie carboxy-

terminale du $\beta 1AR$, et à la troisième boucle intracellulaire des $\beta 2AR$ et $\beta 3AR$. Ces sondes dérivent de régions très divergentes entre les gènes $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$, et sont donc spécifiques : comme l'indique la partie supérieure
5 du Tableau I, chacune des sondes n'hybride qu'avec le gène correspondant.

Il ressort de ce qui précède, que les clones MB1, MB2, MB3, MB4 et MB9 hybrident très fortement avec la sonde Hu $\beta 3$, et hybrident également avec la sonde i3 $\beta 3$.
10 Le clone MB12 hybride très faiblement avec la sonde Hu $\beta 3$ de départ, et pas du tout avec la sonde spécifique i3 $\beta 3$. D'autre part, la comparaison des profils de digestion de ces six clones avec plusieurs enzymes de restriction montre que MB1, MB4, MB9 d'une part, et MB2, MB3 d'autre
15 part, sont identiques, et que ces deux groupes de clones sont chevauchants. Les clones MB1, MB4 et MB9 sont les plus intéressants car la région hybridant avec la sonde est située à peu près au milieu du fragment d'ADN cloné.

Pour montrer que MB1 contient bien le gène $\beta 3$ -adrénergique murin, des expériences d'amplification par PCR ont été réalisées en utilisant comme amorces, soit des oligonucléotides "dégénérés", situés dans les domaines les plus conservés entre les différents gènes β -adrénergiques, soit des oligonucléotides "spécifiques" du
20 gène $\beta 3$ -adrénergique humain, dérivés des séquences les plus divergentes entre les trois gènes. Dans les deux cas, un produit d'amplification de la taille attendue a pu être obtenu en utilisant comme matrice l'ADN du clone MB1.

30 De ces deux expériences, hybridation et amplification, il a pu être déduit que les clones de la famille MB1 contiennent le gène $\beta 3$ -adrénergique murin.

Exemple 2 : Localisation du gène $\beta 3$ -adrénergique dans le clone MB1.

35 L'ADN du clone MB1, qui comprend 14 Kb, a été digéré par douze enzymes de restriction, soit indépendam-

ment, soit deux à deux. Les fragments résultant ont été déposés sur gel d'agarose, transférés sur membrane de nylon, et hybridés avec la sonde Hu β 3. Après lavage et exposition sur film d'autoradiographie, les fragments hybridant avec la sonde ont pu être identifiés, et la carte de restriction du clone MB1 a été établie (figure 1).

Dans le cas de l'utilisation d'une seule enzyme de restriction, on obtient un fragment de 3,6 kb avec BglII, de 13 kb avec PstI, de 4,1 kb avec SacI et de 6,9 kb avec BamHI.

Le plus petit fragment d'ADN hybridant avec la sonde Hu β 3 est un fragment d'environ 1,7 Kb délimité par les sites SacI et BamHI. C'est donc dans ce fragment qu'est localisé le gène β 3-adrénergique murin.

Exemple 3 : Séquençage du gène β 3-adrénergique murin.

On a séquencé le fragment d'ADN d'environ 2 Kb délimité par les sites des enzymes BglII et BamHI (voir figure 1).

Ce fragment d'ADN a été purifié à partir de l'ADN du clone MB1, et sous-cloné dans le site BamHI du vecteur M13mp18. Les clones M13 ayant intégré le fragment d'ADN dans les deux orientations opposées ont été identifiés (clones MB1BB1 et MB1BB2). L'ADN de ces deux clones M13 a été préparé et délété avec l'exonucléase III (ExoIII). Plusieurs délétants ont été isolés, leur ADN simple brin a été préparé et séquencé par la méthode de Sanger.

La séquence nucléotidique du gène β 3 de souris (1180 bp) et des régions non codantes (555 bp en 5' et 186 bp en 3' du gène) est représentée par la formule I. Les sites de restriction contenus dans ce fragment de 1920 bp sont positionnés sur la figure 2.

La comparaison des régions codantes des gènes β 3 humain et murin indique une conservation de 82 % en nucléotides (figure 3) alors qu'ils ne présentent qu'une homologie de l'ordre de 48-55 % avec les gènes RA- β 1 et β 2

de différentes espèces. Le gène $\beta 3$ murin ne contient pas d'intron, et code pour un polypeptide de 388 acides aminés qui présente 82 % d'homologie avec le polypeptide $\beta 3$ humain (figure 4). Cette homologie est principalement
5 concentrée dans les régions transmembranaires (93 %) ("TM").

Exemple 4 : Préparation de sondes spécifiques du gène $\beta 3$ -adrénergique murin.

Trois fragments d'ADN ont été purifiés dans le
10 but d'obtenir une sonde spécifique du gène $\beta 3$ -murin.

La sonde "A19" correspond au fragment BglII-BamHI de 2 Kb qui a été séquencé. Ce fragment a été purifié par migration sur gel d'agarose, électroélution et passage sur une colonne échangeuse d'ions (NACS).

15 La sonde "A20" correspond au produit d'amplification obtenu par PCR à partir du gène $\beta 3$ -murin en utilisant comme amorces les oligonucléotides "dégénérés" (5'-AAGCTTGT/CGTG/CACG/CGCCAGCATC/TGAG/AACCCTGTG-3' et 5'-GTTCGACAAGAAGGGCAGC/ACAGCAGAGG/C/AGTGAA-3' dans un
20 milieu réactionnel comprenant : 100 mM Tris-HCl pH 8,4, 30 mM $MgCl_2$, 0,5 % Tween 20, 0,25 % Nonidet P40, 5 % Formamide et 10 % diméthylsulfoxyde. Le fragment d'ADN obtenu (environ 600 pb) comprend la partie du gène contenue entre les régions transmembranaires TM3 et TM6. Après
25 amplification, les extrémités du fragment A20 ont été remplies avec le fragment "Klenow" de la polymérase I. La sonde a alors été purifiée par migration sur gel de polyacrylamide, électroélution, et passage sur une colonne échangeuse d'ions.

30 La sonde "A21" correspond au produit d'amplification obtenu par PCR à partir du gène $\beta 3$ murin en utilisant comme amorces des oligonucléotides "spécifiques" du gène $\beta 3$ humain (5'-GCATGCTCCGTGGCCTCACGAGAA-3' et 5'-CTGCAGGAGGAGGACAGCAGCA-3') dans un milieu réactionnel
35 comprenant 670 mM Tris-HCl pH 8,4, 67 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml gélatine, 67 μM EDTA, 100 mM β -mercaptoéthanol, 160 mM

(NH₄)₂SO₄, 5 % Formamide et 10 % diméthylsulfoxyde. Le fragment d'ADN obtenu (environ 300 pb) comprend la région amino-terminale du gène, allant du codon d'initiation de la traduction jusqu'à la fin du domaine TM2. La sonde A21
5 a été purifiée de la même façon que la sonde A20.

Les trois sondes ainsi préparées ont été radiomarquées et utilisées dans des expériences d'hybridation d'ADN génomique (Southern blot) pour estimer leur spécificité vis-à-vis du gène $\beta 3$. Des ADN génomiques préparés à partir de foie de souris BALB/c, ont
10 été digérés par une enzyme de restriction (BglIII : traces 1 de la figure 6; BamHI : traces 2 de la figure 6) ; de même l'ADN génomique isolé à partir de cellules A431 (lignée épidermoïde humaine), a été digéré par BamHI
15 (traces 3 de la figure 6) ; les fragments obtenus ont été séparés sur gel d'agarose puis transférés sur membrane de nylon. La membrane a ensuite été hybridée avec une des sondes radiomarquées (A19 : zone A, A20 : zone B ou A21 : zone C de la figure 6), lavée à faible stringence puis
20 autoradiographiée. Chacune de ces sondes détecte une bande unique sur l'ADN génomique de souris BALB/c (figure 6). Dans chacun des cas, la taille du fragment hybridé (3,5 Kb avec l'enzyme BglIII, 6,9 Kb avec l'enzyme BamHI, 13 kb avec l'enzyme PstI et 4,1 kb avec SacI) correspond
25 à celle du gène $\beta 3$ -adrénergique murin qui a été cloné.

Ces résultats indiquent que chacune de ces trois sondes détecte spécifiquement le gène $\beta 3$ -adrénergique de souris. La présence d'une bande unique dans l'ADN total de souris indique qu'il n'y a pas, dans le
30 génome murin, d'autre séquence hautement homologue au gène $\beta 3$ -adrénergique. On peut en conclure qu'il existe chez la souris une seule copie du gène RA- $\beta 3$.

Exemple 5 : Construction d'un vecteur pour l'expression du RA- $\beta 3$ murin.

35 L'étude des propriétés pharmacologiques du produit du gène $\beta 3$ murin exige qu'il soit exprimé à la

surface de cellules eucaryotes, qui possèdent tous les éléments nécessaires à la transduction du signal. Pour pouvoir directement comparer les propriétés des récepteurs $\beta 3$ -AR murin et humain, on a choisi d'exprimer le

5 gène $\beta 3$ de souris dans les cellules de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary), déjà utilisées pour analyser le récepteur $\beta 3$ -AR humain (voir Demande de Brevet français n° 89 00918).

Dans ce système (figure 7), la région codante

10 du gène à analyser est insérée entre le promoteur viral SV40 (ce promoteur fort permet d'obtenir un haut niveau d'expression) et un site de polyadénylation dérivé du virus de l'hépatite B (HBsAg), dans un plasmide comprenant également le gène codant pour la dihydrofolate

15 réductase (DHFR, enzyme qui permet la survie des cellules dans un milieu dépourvu de glycine, d'hypoxanthine et de thymidine).

La carte de restriction du fragment de 2 Kb qui a été séquencé (figure 2) indique la présence d'un

20 site de coupure par l'enzyme NarI à la position 555, soit 15 nucléotides en amont de la région codant du gène $\beta 3$ de souris. L'ADN du clone MB1BB1 (2 Kb insérés dans M13mp18) a été digéré avec les enzymes NarI et BamHI, pour libérer le fragment de 1360 pb contenant la région codante du

25 gène $\beta 3$ et une partie de la région 3' non traduite. Ce fragment d'ADN a été purifié, puis inséré dans le vecteur d'expression aux sites de coupure des enzymes HindIII et BamHI (figure 7). Comme les extrémités générées par les enzymes NarI et HindIII ne sont pas compatibles, on a

30 pris soin, au cours de la digestion enzymatique, de traiter les extrémités NarI de l'insert d'une part, et les extrémités HindIII du vecteur d'autre part, avec le fragment "Klenow" de la polymérase I, de façon à obtenir des bouts francs.

35 On a ainsi obtenu le plasmide recombinant pSTH-Mu $\beta 3$ représenté sur la figure 7.

Exemple 6 : Localisation chromosomique du gène RA- β 3 murin.

- Protocole :

Pour la localisation chromosomique du gène RA- β 3 murin, l'hybridation *in situ* est réalisée sur des lymphocytes, en métaphase, stimulés par la concanavaline A ; ces lymphocytes sont issus de souris mâles WMP, dans lesquelles tous les autosomes, à l'exception de l'autosome 19, sont sous la forme de translocations Robertsonienne.

Les lymphocytes sont cultivés à 37°C pendant 72 h, avec de la 5-bromodésoxyuridine (60 µg/ml) ajoutée à la 65ème heure de culture.

La sonde spécifique est la sonde A21 telle que décrite à l'exemple 4.

Cette sonde est sous-clonée dans le vecteur plasmidique pUC19, marquée au tritium par translation de coupure, de manière à obtenir une activité spécifique de 10^8 d.p.m./µg et est utilisée à une concentration finale de 25 ng/ml de solution d'hybridation.

L'hybridation des cellules en métaphase, les lavages et la coloration sont réalisés comme décrit dans MATTEI et al. (Human Genetics, 1985, 69, 268-271).

- Localisation :

Le gène RA- β 3 murin a été localisé dans la région (8A2→8A4) du chromosome 8 par hybridation chromosomique *in situ*, conformément au protocole ci-dessus.

Dans les 150 cellules en métaphase examinées, il y avait 278 points colorés à l'argent, associés avec les chromosomes : 46 de ces points (16,5 %) étaient localisés sur les chromosomes 8, et 32 d'entre eux (69,5 %) dans la région (8A2→8A4) (figure 8).

La figure 8 comprend en 8A, une métaphase partielle de lymphocyte de souris, montrant le site spécifique de l'hybridation au chromosome 8 ; sur la gauche, la flèche indique les points colorés à l'argent sur les

chromosomes colorés au Giemsa, après autoradiographie ; sur la droite (figure 8B), les chromosomes colorés sont identifiés par "R-banding".

Exemple 7 : Pharmacologie du récepteur RA- β 3 murin.

5 1. Tests mis en oeuvre :

a. test d'accumulation de l'AMPC :

des cellules préconfluentes telles que celles décrites à l'exemple 5 ($5 \cdot 10^5$) sont incubées à 37°C pendant 20 minutes dans 0,5 ml de tampon de HANKS contenant
10 de l'HEPES 20 mM (pH 7,4), de l'acide ascorbique 1 mM, de l'isobutylméthylxanthine 1 mM et différentes concentrations d'agoniste.

Après ébullition pendant 5 min et centrifugation (4 000 r.p.m. 10 min, 4°C), la quantité d'AMPC produite est déterminée en utilisant le kit Amersham AMPC.
15

Pour l'étude de l'inhibition de l'accumulation d'AMPC, les cellules sont préincubées à 37°C pendant 10 min avec un antagoniste, avant l'addition de (-)isoprotérénol 5 nM, suivie d'une incubation pendant
20 20 min.

b. test de liaison de l'ICYP :

des cellules préconfluentes telles que celles décrites à l'exemple 5 (10^5) sont incubées pendant 1 heure à 37°C dans un tampon HANKS contenant de l'HEPES
25 20 mM (pH 7,4), de l'acide ascorbique 1 mM, de la désipramine 2 μ M, de la sérumalbumine bovine 0,05 % et du (-)[125 I]ICYP 70-7 000 pM (2 000 CI/mmol, Amersham).

La liaison non spécifique est déterminée en présence de (-)isoprotérénol 100 μ M.

30 Les incubations sont arrêtées par dilution dans un tampon PBS froid et le ligand lié est séparé du [125 I]ICYP libre par filtration (filtres Whatman GF/C imbibés de polyéthylèneimine à 0,3 %).

Les filtres sont lavés 3 fois avec du tampon
35 PBS froid et la radioactivité est mesurée.

2. Profil pharmacologique :

Pour déterminer le profil pharmacologique du RA- β 3 murin, la région codante de son gène a été insérée dans un vecteur d'expression tel que celui décrit à l'exemple 5.

La liaison à saturation de [125 I]iodocyanopindolol (ICYP) et l'analyse Scatchard correspondante (figure 9, qui comprend en abscisse les log de concentration en ICYP (nM) et en ordonnées, la quantité d'ICYP lié (fmoles) (avec Scatchard)) indique que les cellules CHO transfectées de manière stable (CHO-Mu β 3) expriment $200\,000 \pm 50\,000$ récepteurs/cellule avec une constante de dissociation de 880 ± 88 pM (moyenne $\pm$ SEM, n = 3).

L'accumulation d'AMPC est stimulée par l'incubation des cellules CHO-Mu β 3 avec l'isoprotérénol, la noradrénaline et l'adrénaline (figure 10A).

Cette stimulation est stéréospécifique puisque le (-)isoprotérénol est 20 fois plus actif que le (+)isoprotérénol, comme l'illustre le Tableau II ci-après :

25

30

35

TABLEAU II

5	Ligands	CHO-Muβ3		CHO-Huβ3a	
		A.I. (% d'IPR)	K _{act} ou K _i (nM)	A.I. (% de NA)	K _{act} ou K _i (nM)
10	Agonistes complets :				
	BRL 37344	107,4 ± 8,1	0,4 ± 0,1	87,2 ± 15,4	5,9 ± 1,3
	(-)isoprotérénol	100,0 ± 10,3	4,5 ± 1,8	90,2 ± 2,1	3,9 ± 0,4
	(-)noradrénaline	105,6 ± 5,6	12,9 ± 4,2	100	6,3 ± 0,7
	(-)adrénaline	90,6 ± 2,8	23,0 ± 0,3	100,4 ± 3,8	49,2 ± 5,3
	(+)isoprotérénol	104,0 ± 10,2	99,0 ± 44,0	97,3 ± 10,9	111,0 ± 1,0
	Agonistes partiels :				
	CGP 12177A	74,9 ± 7,9	40,5 ± 8,7	67,6 ± 2,0	138,7 ± 44,3
	oxprenolol	43,8 ± 6,1	535,3 ± 79,3	53,3 ± 6,8	76,7 ± 12,6
	pindolol	35,1 ± 3,1	998,7 ± 187,0	55,0 ± 5,2	153,0 ± 12,0
15	Antagonistes :				
	Propranolol		450,0 ± 221,2		ND
	ICI 118551		4968,9 ± 137,4		770,0 ± 80,0
	CGP 20712A		6424,6 ± 583,6		6700,0 ± 870,0

Sur ce Tableau II, A.I. représente l'activité intrinsèque et correspond au pourcentage de stimulation maximale obtenue pour chaque agoniste, en fonction de l'effet maximal du (-)isoprotérénol, les concentrations basale et maximale en AMPc, induit par l'isoprotérénol, étant respectivement de 25 et 500 pmol par million de cellules.

Les valeurs de K_{act} correspondent à la concentration en agoniste donnant 50 % de la stimulation maximale.

Les valeurs de K_i sont calculées, conformément à CHENG et PRUSOFF (Biochem. Pharmacol., 1973, 22, 3099-3108), avec des C.I.₅₀ définies comme la concentration en antagoniste requise pour induire une inhibition de 50 % de l'activité maximale obtenue avec du (-)isoprotérénol (5 nM).

L'agoniste BRL 37344 est 10 fois plus actif que le (-)isoprotérénol (IPR), pour induire une accumulation d'AMPC (figure 10B, Tableau II).

Les antagonistes β_1 et β_2 CGP 12177A, oxprénolol et pindolol se comportent comme des agonistes partiels du RA- β_3 murin, avec une stimulation maximale de l'accumulation en AMPC de 77 %, 45 % et 36 %, respectivement de celle du (-)isoprotérénol.

Pour d'autres antagonistes β tels que le propranolol (non-sélectif), l'ICI 118551 (β_2 -sélectif) et le CGP 20712A (β_1 -sélectif) (figure 10C), des concentrations micromolaires sont nécessaires pour inhiber l'accumulation d'AMPC induite par le (-)isoprotérénol.

Les figures 10A et 10B comprennent en abscisse le log de la concentration en ligand (M) et en ordonnée le pourcentage d'accumulation en AMPC (pourcentage de la réponse maximale induite par l'isoprotérénol).

La figure 10A correspond aux β -agonistes classiques (■ : (-)isoprotérénol ; □ : (-)noradrénaline ; ● : (-)adrénaline ; ○ : (+)isoprotérénol) ; la figure 10B correspond à des β -agonistes atypiques (□ : BRL 37344 ; ■ : (-)isoprotérénol ; ○ : CGP 12177A ; ● : oxprénolol ; ▲ : pindolol).

La figure 10C comprend en abscisse le log de la concentration en ligand (M) et en ordonnée le pourcentage d'inhibition de l'accumulation d'AMPC (pourcentage de la réponse induite par l'isoprotérénol 5 nM) et correspond à l'action des antagonistes β en présence de (-)isoprotérénol 5 nM (▲ : (-)propranolol ; ○ : ICI 118551 ; ■ : CGP 20712A).

3. Distribution tissulaire :

L'analyse par hybridation avec la sonde A21, de l'ARN total (technique de Northern), extrait de différents tissus de souris, révèle une bande majeure à 2,2 kb aussi bien dans le tissu adipeux blanc que dans le tissu adipeux brun.

Dans les adipocytes différenciés 3T3-F442A, un transcrit majeur de taille similaire (2,2 kb) aussi bien qu'un transcrit mineur de 2,8 kb sont détectés (figure 11).

5 On ne détecte aucun signal d'hybridation dans l'ARN total préparé à partir d'autres tissus (muscle fémoral, poumon, foie, iléum, colon, cerveau, estomac, coeur et rein).

10 Le profil pharmacologique ci-dessus du RA- β 3 murin évoque un récepteur agissant sur la lipolyse (récepteur du type RA- β atypique impliqué dans le contrôle des dépenses énergétiques des cellules adipeuses de rongeur).

Par exemple, l'effet agoniste puissant de 15 BRL 37344 sur le RA- β 3 rappelle son efficacité pour la stimulation de l'accumulation d'AMPC, de la lipolyse et de la thermogénèse chez les cellules de rat obèse.

L'agoniste spécifique du RA- β 3 CGP 12177A stimule la lipolyse et l'activité adénylate cyclase.

20 La figure 11 représente une hybridation entre la sonde A21 et l'ARN total (30 μ g) de tissus de souris ou de lignées cellulaires adipeuses 3T3-F442A (au jour 7 de la différenciation), après transfert d'ARN (technique de Northern).

25 Dans cette figure 11, WAT signifie tissu adipeux blanc ; BAT signifie tissu adipeux brun.

Les tailles des transcrits s'hybridant sont indiqués en kb, sur la droite et la position des bandes d'ARNr 28S et 18S est représentée sur le côté gauche de 30 la figure.

4. Comparaison avec le RA- β 3 humain :

a. Points communs :

La comparaison des propriétés pharmacologiques est illustrée au Tableau II ci-dessus.

35 L'antagoniste β -adrénergique marqué [125 I]ICYP se lie au RA- β 3 murin et au RA- β 3 humain avec une affinité

similaire, qui est de l'ordre de 10 à 20 fois inférieure à celle obtenue avec les RA- β 1 et RA- β 2.

De la même manière, les antagonistes tels que le propranolol, l'ICI 118551 et le CGP 20712A sont des inhibiteurs faibles de l'accumulation d'AMPC induite par l'isoprotérénol.

Comme le récepteur humain, le RA- β 3 murin peut être activé par les antagonistes β 1 et β 2 : CGP 12177A, oxprénolol et pindolol.

Ces deux types de récepteurs (murin et humain) présentent une stéréosélectivité faible.

b. Différences :

Dans les domaines transmembranaires, qui sont impliqués dans la liaison au ligand, on note la présence de 12 substitutions entre les deux récepteurs.

De plus, les 30 résidus C-terminaux du β 3 de souris ne présentent pas d'homologie avec la queue C-terminale du récepteur β 3 humain (figure 5). Le RA- β 3 murin comprend un résidu tyrosine en position 360 de la séquence en acides aminés, qui n'existe pas dans la séquence du RA- β 3 humain (figure 5).

Les différences les plus marquantes apparaissent dans les boucles intracytoplasmiques près des régions transmembranaires, où 3 résidus arginine (positions 61, 150 et 289 du RA- β 3 murin) sont remplacés par un tryptophane, une cystéine et une autre cystéine, respectivement dans le RA- β 3 humain.

De telles différences pourraient être à l'origine des modifications pharmacologiques telles que celle de la puissance accrue de l'agoniste BRL 37344 chez la souris, qui permet notamment, l'étude du métabolisme du tissu adipeux ; en effet, le RA- β 3 murin est, de manière inattendue, suffisamment proche du RA- β 3 humain pour une telle étude.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de

mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans
5 s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

32
No de la demande internationale: PCT/

MICRO-ORGANISMES	
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 11, ligne 24 de la description 1	
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT *	
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire ☐	
Nom de l'institution de dépôt *	
Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) *	
28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cédex 15 (FRANCE)	
Date du dépôt *	N° d'ordre *
14 janvier 1991	I-1026
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES * (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements ☐	
" En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".	
C. ÉTATS DESIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES * (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
EUROPE JAPON ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE	
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT * (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international * (spécifier la nature générale des indications p. ex., «No d'ordre du dépôt»)	
E. ☐ La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
14 JAN. 1992 M. ROCHE	
(Fonctionnaire autorisé)	
☐ Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international 1"	
(Fonctionnaire autorisé)	

REVENDICATIONS

1') Séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène murin codant pour un peptide ayant une activité de récepteur β 3-adrénergique.

5 2') Séquence selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte 1920 paires de bases et comprend la séquence en nucléotides de formule I ci-après :

10

15

20

25

30

35

34

	GATCTGTAATCCCAGCACTGGGGAGGTTGAGGCAGAAGGATCTGGAGGTCCAGACCAATC	60
	TGGGCAACATATAGAAAGACTATCTCAAACAATAAGATACCTTAGGGAGAGCATCCAAGC	120
	AGAAGAGGGGCTATCTTGGATGGTTTGGGTTGTTTCGGTTTTTGGTTTGGTTTCTGGGA	180
	TGGTTGCCTTCCTTGTGGGTAAAGGATAGGGTGCGGGGGTTTCTCTTCTTGCAGGGTT	240
	GCCTCAGGTTCTGCCAGGAAGGAGCTGCTGAGCTCCAGGAAACCGGTGCTGAGGGAGTGT	300
5	CAAGACAGGACGCCCCCTCTCCACCCTCCAATTCCCACCAGAGGCCTCTCTTGTGACTATT	360
	GGACGCTGTTTCCTTTAAAAGCAGCCACTCCTCCCGGCAACTAGGGTGTACATGGGGGGTG	420
	AGATGGAGGGAAGCTGACAGACTTACCCAGCAATTAGGGAAGATGGCCCAGGCTGGAAG	480
	AGTCGCTCCCAAGCCCTACTGTCCCTTCCCTAAGCCAGCGGGTCTGGGGAGGAGGGGGA	540
	ACCTTCCCACCCCAGGCGCCACACGAG ATG GCT CCG TGG CCT CAC AGA AAC	591
10	GGC TCT CTG GCT TTG TGG TCG GAC GCC CCT ACC CTG GAC CCC AGT	636
	GCA GCC AAC ACC AGT GGG TTG CCA GGA GTA CCA TGG GCA GCG GCA	681
	TTG GCT GGG GCA TTG CTG GCG CTG GCC ACG GTG GGA GGC AAC CTG	726
	CTG GTA ATC ATA GCC ATC GCC CGC ACG CCG AGA CTA CAG ACC ATA	771
	ACC AAC GTG TTC GTG ACT TCA CTG GCC GCA GCT GAC TTG GTA GTG	816
	GGA CTC CTC GTA ATG CCA CCA GGG GCC ACA TTG GCG CTG ACT GGC	861
15	CAT TGG CCC TTG GGC GAA ACT GGT TGC GAA CTG TGG ACG TCA GTG	906
	GAC GTG CTC TGT GTA ACT GCT AGC ATC GAG ACC TTG TGC GCC CTG	951
	GCT GTG GAC CGC TAC CTA GCT GTC ACC AAC CCT TTG CGT TAC GGC	996
	ACG CTG GTT ACC AAG CGC CGC GCC CGC GCG GCA GTT GTC CTG GTG	1041
	TGG ATC GTG TCC GCT GCC GTG TCC TTT GCG CCC ATC ATG AGC CAG	1086
20	TGG TGG CGT GTA GGG GCA GAT GCC GAG GCA CAG GAA TGC CAC TCC	1131
	AAT CCG CGC TGC TGT TCC TTT GCC TCC AAC ATG CCC TAT GCG CTG	1176
	CTC TCC TCC TCC GTC TCC TTC TAC CTT CCC CTC CTT GTG ATG CTC	1221
	TTC GTC TAT GCT CGA GTG TTC GTT GTG GCT AAG CGC CAA CGG CAT	1266
	TTG CTG CGC CGG GAA CTG GGC CGC TTC TCG CCC GAG GAG TCT CCG	1311
25	CCG TCT CCG TCG CGC TCT CCG TCC CCT GCC ACA GGC GGG ACA CCC	1356
	GCG GCA CCG GAT GGA GTG CCC CCC TGC GGC CGG CGG CCT GCG CGC	1401
	CTC CTG CCA CTC CGG GAA CAC CGC GCC CTG CGC ACC TTA GGT CTC	1446
	ATT ATG GGC ATC TTC TCT CTG TGC TGG CTG CCC TTC TTC CTG GCC	1491
	AAC GTG CTG CGC GCA CTC GCG GGG CCC TCT CTA GTT CCC AGC GGA	1536
	GTT TTC ATC GCC CTG AAC TGG CTG GGC TAT GCC AAC TCC GCC TTC	1581
30	AAC CCG GTC ATC TAC TGC CGC AGC CCG GAC TTT CGC GAC GCC TTC	1626
	CGT CGT CTT CTG TGT AGC TAC GGT GGC CGT GGA CCG GAG GAG CCA	1671
	CGC GCA GTC ACC TTC CCA GCC AGC CCT GTT GAA GCC AGG CAG AGT	1716
	CCA CCG CTC AAC AGG TAG GGGACACGAGCGGGGGACCGGAGTCTCTGGGTGGGG	1770
	ACGTCTCTGTCTCTATTTTTTGTGTTTGGAGATTGGGGGAGGGGAAGATGTAGATGGGGGT	1830
35	GCGGTGTGTGTGTGGGTGGGGGGTGGCCTTTGTCTTGAGAGGACAGAAAAGAGGTAGGAA	1890
	CTAAAACGGGCCCTTTCTCTTCTTGGATCC	1920

(I)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

ainsi que les séquences dérivées de celle-ci et les fragments de ladite séquence et des séquences dérivées.

3') Séquence selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend notamment les sites de restriction uniques suivants :

AlwN I, Sac I, Stu I, Dra I, Mse I, Bbe I, Nar I, Xcm I, NCo I, BspM I, Afl III, Pvu I, Nhe I, BstE II, BspH I, Bsm I, Nsp7524 I, NspH I, Xho I, Sac II, Eag I, Nae I, PaeR7 I, EcoN I, Fsp I, Bbv II, Nru I, Drd I, BamH I.

4') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 1164 paires de bases nucléotidiques, qui correspond aux nucléotides 568-1731 de la séquence de formule I.

5') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 1360 paires de bases contenant la région codante du gène $\beta 3$ murin et une partie de la région 3' non traduite.

6') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 280 paires de bases nucléotidiques, qui correspond aux nucléotides 1640-1920 de la séquence de formule I.

7') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 608 paires de bases nucléotidiques, situé entre les régions transmembranaires TM3 et TM6 et qui correspond aux nucléotides 895-1503 de la séquence de formule I.

8') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 297 paires de bases nucléotidiques, allant du codon d'initiation de la traduction jusqu'à la fin du domaine TM2 et qui correspond aux

nucléotides 567-864 (région du gène codant pour la partie amino-terminale du peptide) de la séquence de formule I.

9') Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles s'hybrident avec les séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 mais ne s'hybrident pas avec les gènes codant pour les récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, ni avec l'ARN messenger desdits récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, et en ce qu'elles sont éventuellement marquées à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou toute autre substance non radioactive appropriée.

10') Sonde selon la revendication 9, caractérisée en ce que sa séquence est homologue ou complémentaire de celle d'un segment d'au moins 10 paires de bases de la séquence I.

11') Sonde selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

12') Peptide et/ou fragment de celui-ci, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, et en ce qu'il présente une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique, à savoir que, lorsque le fragment est exposé à la surface d'une cellule, il est capable de participer à l'activation de l'adénylate cyclase en présence d'un des agonistes suivants : BRL 28410, BRL 37344, CGP 12177A et (1)-isoprotérénol ; soit il est susceptible d'être reconnu par des anticorps qui ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique $\beta 1$, ni le récepteur adrénergique $\beta 2$; soit il est susceptible de générer des anticorps qui ne reconnaissent ni le récepteur $\beta 1$, ni le récepteur $\beta 2$.

13') Peptide selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend 388 amino-acides et présente la séquence en amino-acides de formule II suivante :

Met-Ala-Pro-Trp-Pro-His-Arg-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Leu-Trp-Ser-Asp-Ala-Pro-Thr-Leu-Asp-Pro-Ser-Ala-Ala-Asn-Thr-Ser-Gly-Leu-Pro-Gly-Val-Pro-Trp-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala-Gly-Ala-Leu-Leu-Ala-Leu-Ala-Thr-Val-Gly-Gly-Asn-Leu-Leu-Val-Ile-

5 Ile-Ala-Ile-Ala-Arg-Thr-Pro-Arg-Leu-Gln-Thr-Ile-Thr-Asn-Val-Phe-Val-Thr-Ser-Leu-Ala-Ala-Ala-Asp-Leu-Val-Val-Gly-Leu-Leu-Val-Met-Pro-Pro-Gly-Ala-Thr-Leu-Ala-Leu-Thr-Gly-His-Trp-Pro-Leu-Gly-Glu-Thr-Gly-Cys-Glu-Leu-Trp-Thr-Ser-Val-Asp-Val-Leu-Cys-Val-Thr-Ala-Ser-Ile-Glu-Thr-Leu-Cys-

10 Ala-Leu-Ala-Val-Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Val-Thr-Asn-Pro-Leu-Arg-Tyr-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Lys-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-Ala-Val-Val-Leu-Val-Trp-Ile-Val-Ser-Ala-Ala-Val-Ser-Phe-Ala-Pro-Ile-Met-Ser-Gln-Trp-Trp-Arg-Val-Gly-Ala-Asp-Ala-Glu-Ala-Gln-Glu-Cys-His-Ser-Asn-Pro-Arg-Cys-Cys-Ser-Phe-Ala-

15 Ser-Asn-Met-Pro-Tyr-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Ser-Val-Ser-Phe-Tyr-Leu-Pro-Leu-Leu-Val-Met-Leu-Phe-Val-Tyr-Ala-Arg-Val-Phe-Val-Val-Ala-Lys-Arg-Gln-Arg-His-Leu-Leu-Arg-Arg-Glu-Leu-Gly-Arg-Phe-Ser-Pro-Glu-Glu-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Ser-Pro-Ser-Pro-Ala-Thr-Gly-Gly-Thr-Pro-Ala-Ala-Pro-

20 Asp-Gly-Val-Pro-Pro-Cys-Gly-Arg-Arg-Pro-Ala-Arg-Leu-Leu-Pro-Leu-Arg-Glu-His-Arg-Ala-Leu-Arg-Thr-Leu-Gly-Leu-Ile-Met-Gly-Ile-Phe-Ser-Leu-Cys-Trp-Leu-Pro-Phe-Phe-Leu-Ala-Asn-Val-Leu-Arg-Ala-Leu-Ala-Gly-Pro-Ser-Leu-Val-Pro-Ser-Gly-Val-Phe-Ile-Ala-Leu-Asn-Trp-Leu-Gly-Tyr-Ala-Asn-Ser-

25 Ala-Phe-Asn-Pro-Val-Ile-Tyr-Cys-Arg-Ser-Pro-Asp-Phe-Arg-Asp-Ala-Phe-Arg-Arg-Leu-Leu-Cys-Ser-Tyr-Gly-Gly-Arg-Gly-Pro-Glu-Glu-Pro-Arg-Ala-Val-Thr-Phe-Pro-Ala-Ser-Pro-Val-Glu-Ala-Arg-Gln-Ser-Pro-Pro-Leu-Asn-Arg (II),

lequel peptide présente 82 % d'homologie avec le peptide

30 β 3 humain.

14') Fragment du peptide selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de 25 amino-acides, correspondant à la région transmembranaire TMI de la séquence de formule II.

15 15') Fragment du peptide selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de

30 aminoacides, correspondant au fragment COOH terminal de la séquence de formule II.

16') Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une
5 séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

17') Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il est constitué par un vecteur recombinant approprié comprenant en particulier une origine de
10 répllication dans un microorganisme hôte approprié, notamment une bactérie ou une cellule eucaryote, au moins un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des cellules eucaryotes ayant reçu ledit vecteur, une séquence régulatrice appropriée, notamment
15 un promoteur permettant l'expression des gènes dans lesdites bactéries ou cellules eucaryotes, et dans lequel est insérée une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, lequel vecteur est un vecteur d'expression d'un peptide,
20 d'un fragment de peptide ou d'une combinaison de fragments de peptides ayant une activité de récepteur β 3-adr-énergique murin..

18') Vecteur selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il est constitué successivement d'une
25 origine de répllication approprié, d'un gène de résistance à l'ampicilline, du promoteur viral SV40 d'une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 codant pour un peptide ayant une activité de récepteur β 3-adr-énergique murin, d'un site de polyadénylation
30 dérivé du virus de l'hépatite B (HBsAg) et du gène codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme qui permet la survie des cellules dans un milieu dépourvu en glycine, hypoxanthine et thymidine.

19') Vecteur selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il a été déposé sous le n° I-1026 en date
35

du 14 janvier 1991 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

20') Cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 16 à 19.

21') Cellule hôte selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle est notamment constituée par les cellules de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary).

22') Processus d'expression d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que la cellule hôte, résultant de la transformation par un vecteur contenant une séquence nucléotidique ou un fragment de celle-ci, codant pour un peptide d'origine murine ayant une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique ou un fragment de celui-ci, est cultivée de manière à produire et à transporter ledit peptide exprimé vers la membrane, de telle sorte que les séquences transmembranaires dudit récepteur $\beta 3$ soient exposées à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé.

23') Modèle d'étude des récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques, caractérisé en ce qu'il est constitué par des cellules hôtes selon l'une quelconque des revendications 20 et 21, c'est-à-dire exprimant un récepteur $\beta 3$ -adrénergique murin à la surface de leur membrane.

24') Procédé de détection de la capacité d'une substance à se comporter comme ligand vis-à-vis d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, lequel procédé comprend :

- la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, laquelle cellule hôte exprime ledit peptide murin ($RA\beta 3$ murin), le cas échéant après induction physique ou chimique appropriée, et laquelle mise en contact est réalisée dans des conditions permettant la formation d'une

liaison entre l'un au moins des sites spécifiques et ladite substance s'il y a lieu et

- la détection de la formation éventuelle d'un complexe du type ligand-peptide.

5 25') Méthode de production de souris transgéniques surexprimant le récepteur β 3-adrénergique, laquelle méthode comprend l'introduction de plusieurs copies d'un segment comprenant au moins la séquence de formule I selon la revendication 2 associée à un promoteur convenable, dans les cellules d'un embryon de souris à un stade précoce.

 26') Méthode de production selon la revendication 25, caractérisée en ce que le promoteur est le promoteur du gène RA-Mu β 3, notamment de façon à respecter sa
15 répartition tissulaire d'origine.

 27') Méthode de production selon la revendication 25, caractérisée en ce que le promoteur est un promoteur d'un gène exprimé spécifiquement dans un tissu, notamment le promoteur de l'actine musculaire.

20 28') Souris transgéniques, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par la méthode de production selon les revendications 25 à 27.

 29') Méthode de production de souris recombinantes, n'exprimant plus le récepteur β 3-adrénergique,
25 caractérisée en ce que :

- l'on réalise, dans la séquence de formule I, selon la revendication 2, une mutation convenable qui inhibe l'expression du gène codant pour le récepteur β 3-adrénergique murin ;

30 - l'on introduit ladite séquence I modifiée dans un segment de l'ADN génomique de souris, associé à un marqueur approprié, de manière à obtenir une séquence marquée M, contenant la séquence de formule I modifiée ;

- l'on intègre ladite séquence M, *in vitro*,
35 dans les cellules souches de lignées germinales d'embryon de souris ; puis

- l'on réinjecte lesdites cellules souches à une souris ; et après recombinaison homologue,

- l'on obtient à la génération F2 des souris recombinaisons homozygotes, reconnaissables à la présence du
5 marqueur.

30') Méthode selon la revendication 29, caractérisée en ce que ledit segment d'ADN génomique de souris comprend au plus 14 Kbases.

31') Méthode selon la revendication 30, caractérisée en ce que lorsque ledit fragment est de 14
10 Kbases, il comprend notamment les sites de restriction suivants : 3 sites SphI, 2 sites BamHI, 2 sites HindIII, 4 sites XbaI, 4 sites SacI, 1 site KpnI, 1 site SmaI, 2 sites BglII, 2 sites PvuII, 1 site PstI et 1 site EcoRI.

32') Méthode selon l'une quelconque des revendications 29 à 31, caractérisée en ce que la séquence de formule I mutée est comprise entre un site BglII et un site BamHI du segment d'ADN génomique de souris.
15

33') Souris recombinantes, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par la méthode de production de souris recombinantes selon l'une quelconque des revendications 29 à 32.
20

34') Procédé pour l'étude de l'affinité d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 12 à 15 pour un ou plusieurs ligands déterminés, lequel procédé comprend :
25

- la transformation d'une cellule hôte appropriée par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 16 à 19 ;

30 - la culture de la cellule hôte transformée, dans des conditions permettant l'expression du récepteur $\beta 3$ codée par la séquence nucléotidique, et le transfert du récepteur $\beta 3$ exprimé vers la membrane de ladite cellule, de sorte que les séquences transmembranaires du
35 récepteur $\beta 3$ soient exposées à la surface de la cellule hôte transformée ;

- la mise en contact de ladite cellule avec les ligands déterminés ; et

- la détection d'une réaction affine entre ladite cellule transformée et lesdits ligands déterminés.

5 35') Kit ou trousse de détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour un peptide selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, lequel kit comprend :

- une culture de cellules hôtes transformées par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des
10 revendications 16 à 19 ;

- des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression d'un peptide (récepteur $\beta 3$ murin ou un fragment de celui-ci) codé par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, contenue
15 dans un vecteur dont le promoteur est inductible ;

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour ledit peptide ; et

- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique du peptide ex-
20 primé.

36') Anticorps dirigés de façon spécifique contre l'un des peptides selon l'une quelconques 12 à 15, caractérisés en ce qu'ils ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique $\beta 1$, ni le récepteur adrénergique $\beta 2$.

25 37') Anticorps selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'ils sont des anticorps polyclonaux.

38') Anticorps selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'ils sont des anticorps monoclonaux.

1 Kb

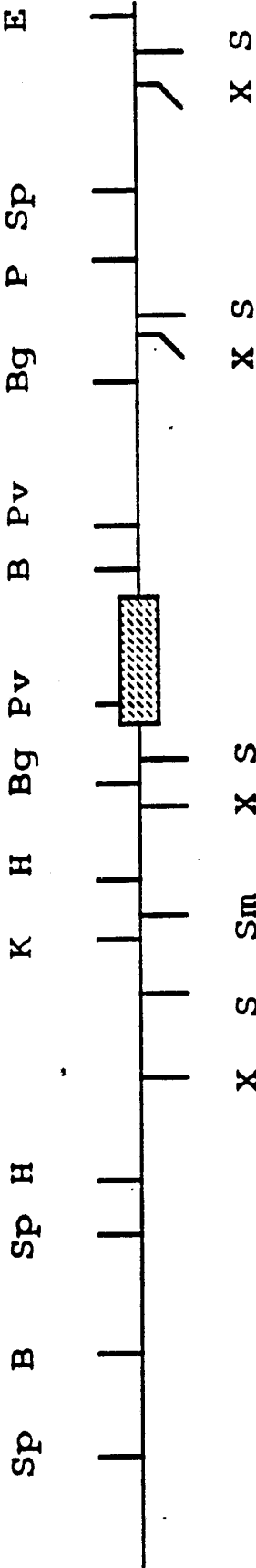
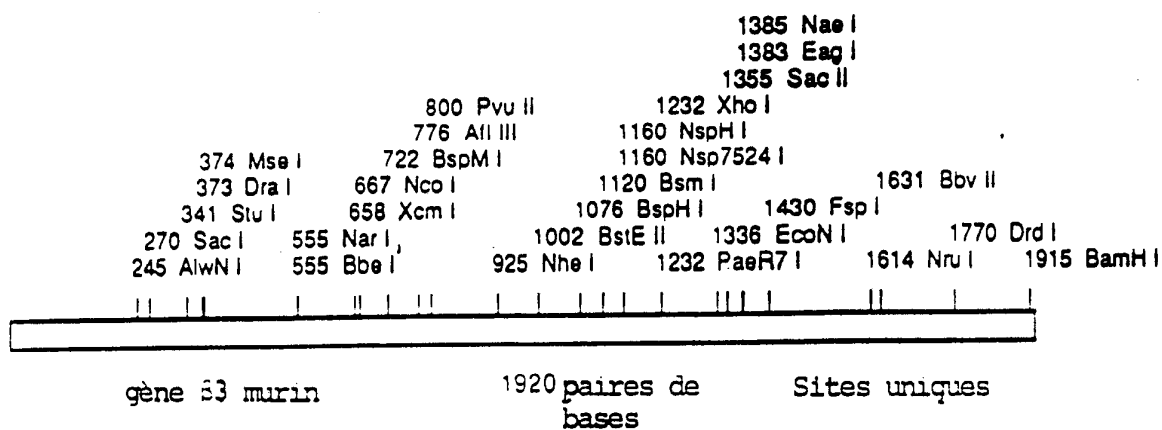


FIGURE 1

B :	BamHI	Pv :	PvuII
Bg :	BglII	S :	SacI
E :	EcoRI	Sm :	SmaI
H :	HindIII	Sp :	SphI
K :	KpnI	X :	XbaI
P :	PstI		

2/12

FIGURE 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

[illegible]

FIGURE 3

[illegible]

FEUILLE DE REMPLACEMENT

5/12

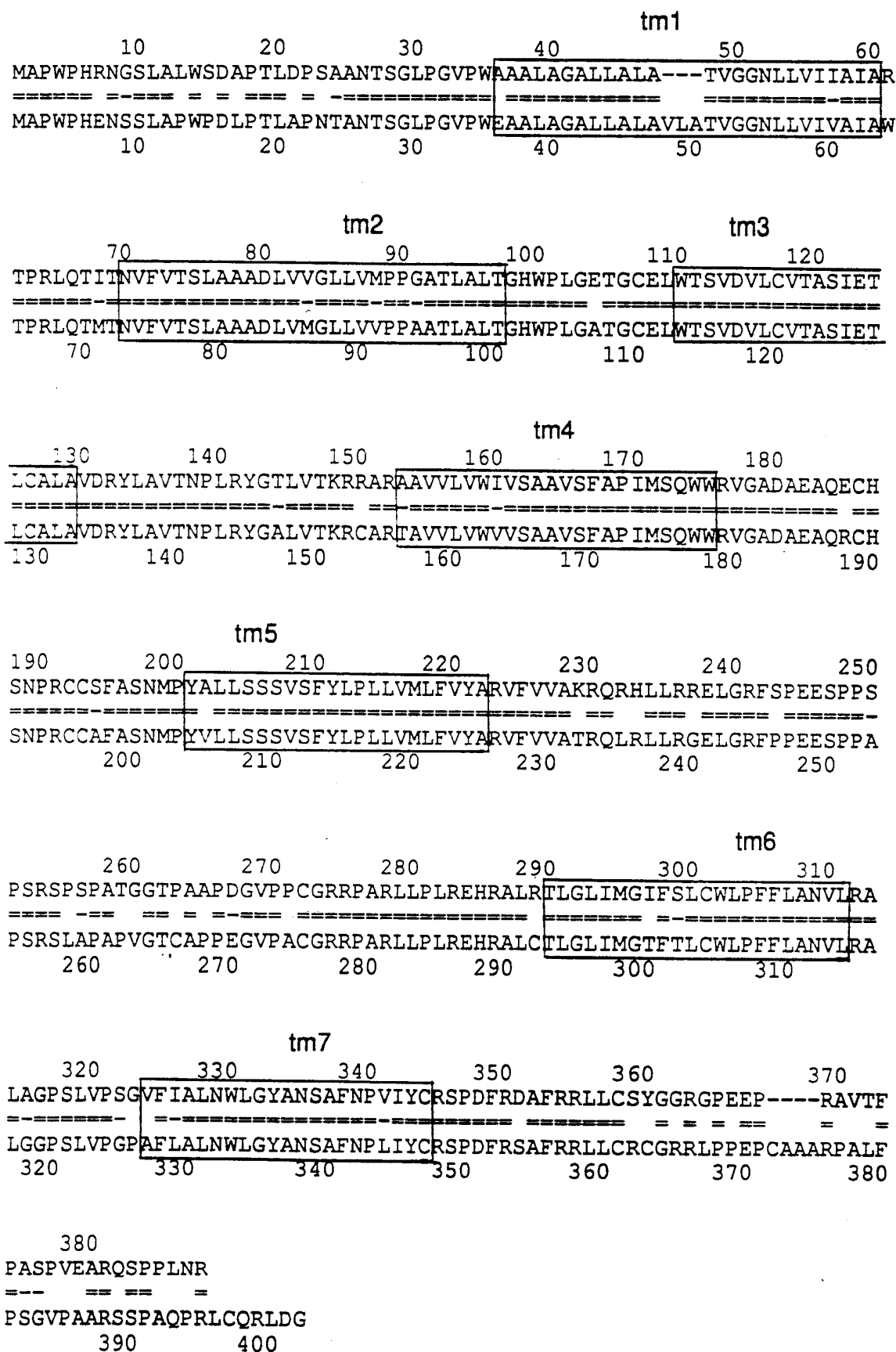


FIGURE 4

83-AR	MAPPHENSSSLAPWPDLP	TLAPNTANTSG	LPVWEAALAGALLALAVLATV	GGNLLVIVAIAWT	PRLQTM	NVFTSL	79
M83-AR	-----R-G---	L-S-A---	D-SA-----	A-----	I-----	R-----	76
81-AR	MGAGVLVLGASEPGNLS	SAAPLDGAATAAR-	LVPASP-ASLLPP-	SESPE-LSQQWT-	GM-L-M--	I-LI-A--V-----	100
82-AR	MGQPGNGSAFLA-	NGSHAPDHDVT	QORDEVWV-M-	IVMS-I--	I-F--V--	T---KFE---V-Y-I---	75
83-AR	AAADLVMGLLVPPAAT	LALTGHWPLGATG	CELWTSVDVLCV	TASIELCALAVD	RYIAVTNPL	RYGALVTKRCARTAVVLVWVVSAAVSEFAPIMSQWWR	179
M83-AR	-----V---	M-G-----	E-----	T-----	R-A-----	I-----	176
81-AR	-S-----	FG--IVVM-R-EY-	SFF-----	VI-L-----	I-S-F--	QS-L-RAR--GL-CT--AI--L--L--LMH---	200
82-AR	-C-----	A---FG-AHI-MKM-	TF-NEW--F--	I-----	F-I-S-FK-QS-L-	NK--VIIIM--I--GLT--L--QMH-Y-	175
83-AR	VGADAEAQCHSNPRCCA	FASNMPYVLLSSSV	SFYLP	LLVMLFVYARV	FVVATQRLRL	RGELGRF PPEESPAPSRSLAPAPVGTCAPPE	270
M83-AR	-----E---	S-----	A-----	K--RH--	R-----	S-----PS--TG--P-A-D	267
81-AR	AES- --R--	YND-K--D-VT-	RA-AIA--V--	--V--CI-A--	L---RE-QK-VKKID	SCE--S--P-PV---APPPG--RPAAAAATA	299
82-AR	ATHQ --IN-YA-	ET--DEFT-QA-	AIA--I--	--V--VI-V--	S---QE-K--	QKIDKSE---HVQNL-QVEQ	250

FIGURE 5

	TWVI	I I I I I TTVII	I ! I ! I !	
M03-AR	GVPACGRRRPARLLPLREHRACTLGLIMGTFTLCWLPPFFLANVLRALGGPSLVPGPAFLANWLGYANSAFNPLIYCRSPDERSAERRLCRCGRRL			367
M03-AR	--P-----R-I-S-----A--SGV-I-----V-----D-----SY-G-G			364
M1-AR	PLANCR-GK---S--VA---QK-K---I-V-----VK-FHRE ---DRJ-VFF-----I-----K-QG---CAR-AA			398
M2-AR	DGRTHGHL--SSKE C-K-K-K--I-IV-HVIIQN -IRKEYYL--I-V-G-----I-QE---LRRSS-			347
M3-AR	PPEPCAAARPALFPGVPAARSSPAQRCLCQLRDG			402
M03-AR	-E-R-VTF--SPVEARQSPLLNR			388
M1-AR	RRRHATHGDRPRASGCLEARPGPP-SPGAASDDD-DDVVGATPPARLLLEPWAGCNCGAAAADSDSLDEPCRPFASESKV			477
M2-AR	KAYNGYSNGNTGEOSGYHVQEKENK-LCEDLPGTEDFVGHQGVTPSDNI DSQGRNCSTND SLL			413

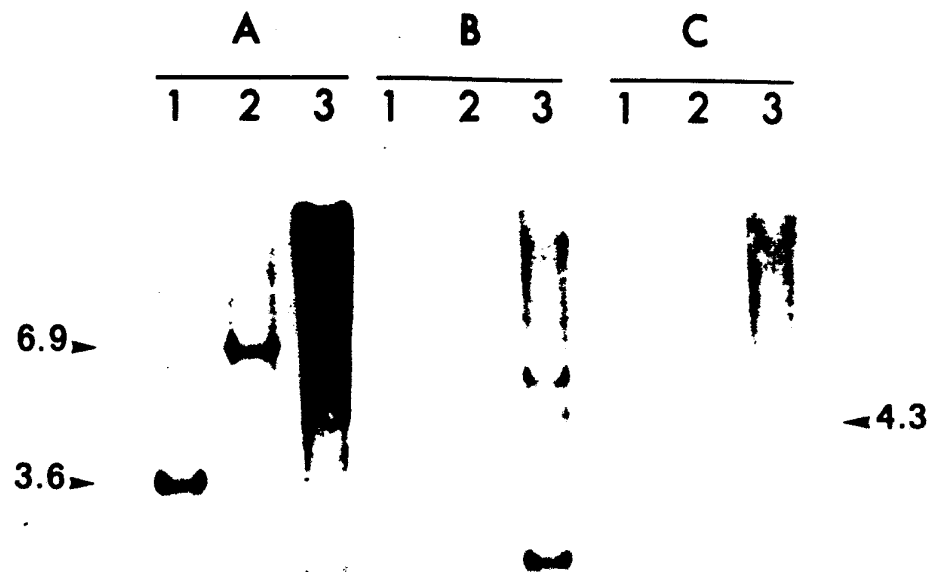
FIGURE 5 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

7/12

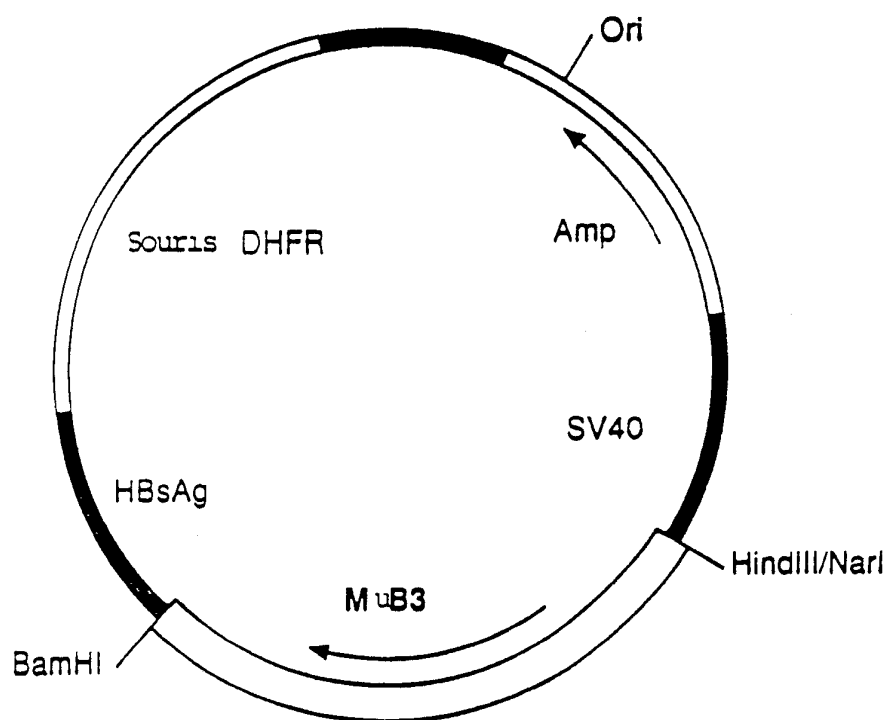
413

8/12

FIGURE 6

9/12

Plasmide PSTH-MuB3

FIGURE 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10/12

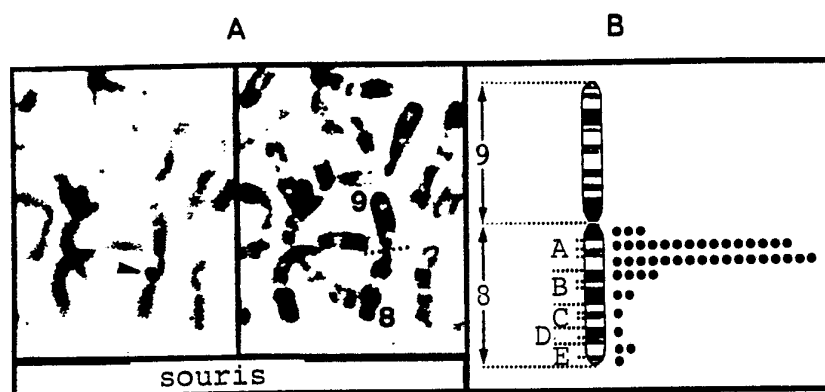


FIGURE 8

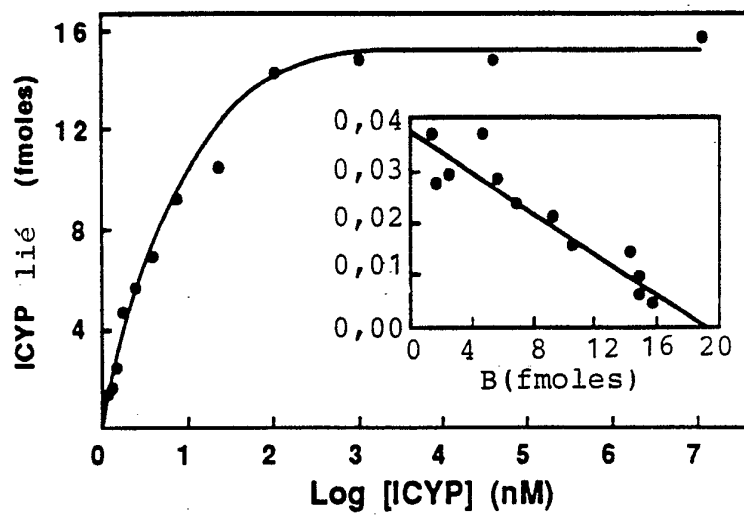


FIGURE 9

11/12

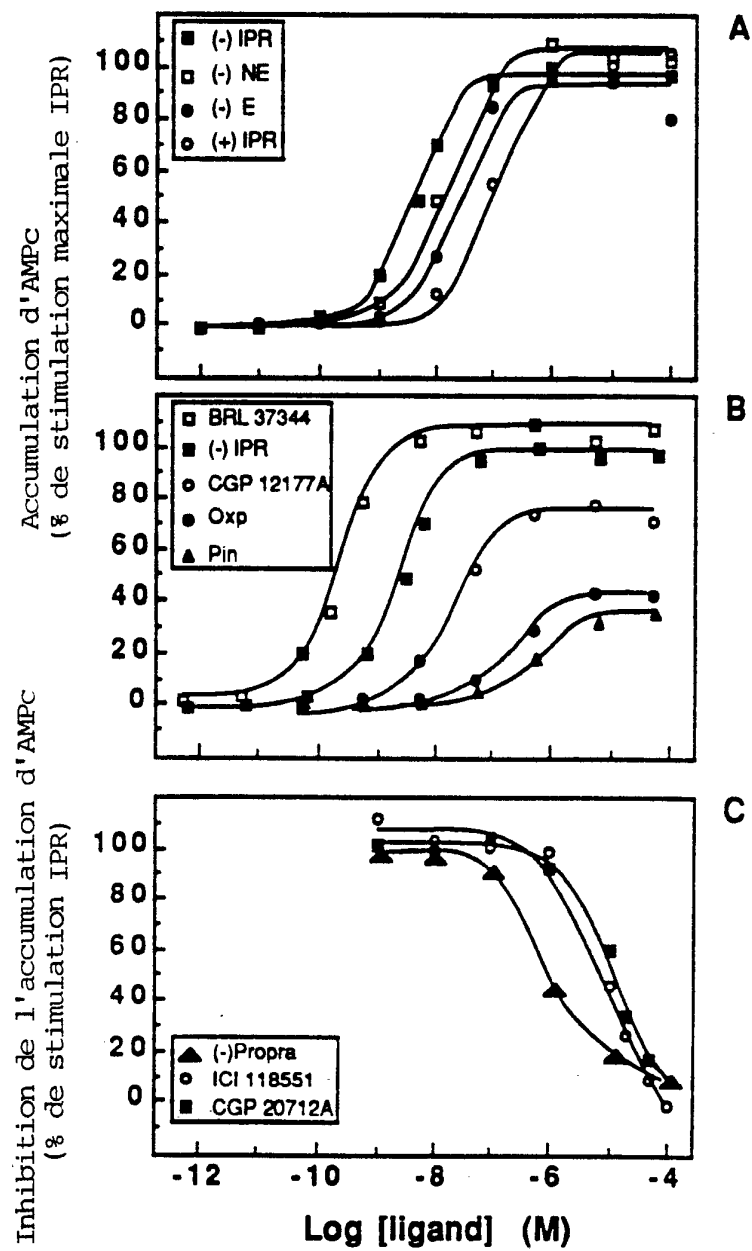


FIGURE 10

12/12

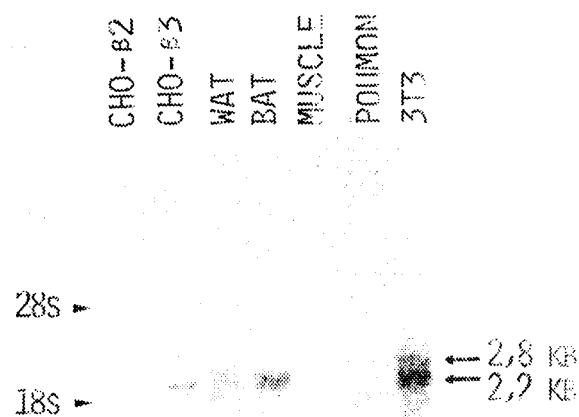


FIGURE 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 92/00023

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵	C12N15/12; C12P21/08;	C07K13/00; G01N33/50; C07K15/00; A01K67/027 C12N15/00
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C07K ; C12N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
P, X	EMBO JOURNAL. vol. 10, no. 12, December 1991, EYNHAM, OXFORD GB pages 3721 - 3727; Nahmias C; Blin N; Elalouf JM; Mattei MG; Strosberg AD; Emorine LJ: 'Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes.' see the whole document ---	1-38
X	SCIENCE. vol. 245, 8 September 1989, LANCASTER, PA US pages 118 - 1121; Emorine, L.J. et al.: 'Molecular characterization of the human α 3-adrenergic receptor.' see the whole document --- -/-	9-11
* Special categories of cited documents: ¹⁰ "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 "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		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search 29 April 1992 (29.04.92)		Date of Mailing of this International Search Report 11 May 1992 (11.05.92)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	WO, A, 9 008 775 (CNRS, FRANCE) 9 August 1990 see the claims	9-11
X	EP, A, 0 351 921 (MERCK & CO. INC.; USA) 24 January 1990 see the whole document	9-11

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200023
SA 56390

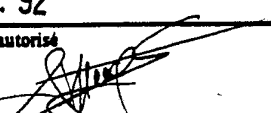
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 29/04/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9008775	09-08-90	FR-A- 2642075 EP-A- 0455682	27-07-90 13-11-91
EP-A-0351921	24-01-90	JP-A- 2084121	26-03-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00023

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/12; C12P21/08;	C07K13/00; G01N33/50;	C07K15/00; A01K67/027 C12N15/00
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K ; C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
P, X	EMBO JOURNAL. vol. 10, no. 12, Décembre 1991, EYNHAM, OXFORD GB pages 3721 - 3727; Nahmias C; Blin N; Elalouf JM; Mattei MG; Strosberg AD; Emorine LJ: 'Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes.' voir le document en entier ---	1-38
X	SCIENCE. vol. 245, 8 Septembre 1989, LANCASTER, PA US pages 118 - 1121; Emorine, L.J. et al.: 'Molecular characterization of the human α 3-adrenergic receptor.' voir le document en entier --- -/--	9-11
¹¹ 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 postérieurement à la date de dépôt international ou à 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 "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. "A" document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
29 AVRIL 1992	11.05.92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	NAUCHE S.A. 	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
X	WO,A,9 008 775 (CNRS, FRANCE) 9 Août 1990 voir les revendications ---	9-11
X	EP,A,0 351 921 ((MERCK & CO.INC.; USA) 24 Janvier 1990 voir le document en entier ---	9-11

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

FR 9200023
SA 56390

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale 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. 29/04/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9008775	09-08-90	FR-A- 2642075 EP-A- 0455682	27-07-90 13-11-91
EP-A-0351921	24-01-90	JP-A- 2084121	26-03-90

EPO FORM P002

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82