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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
19 décembre 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/101061 A3

(51) Classification internationale des brevets[7] :
C12N 15/82, A01H 5/00, 5/10, C12Q 1/68

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/01656

(22) Date de dépôt international : 16 mai 2002 (16.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/07597 11 juin 2001 (11.06.2001) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **RHO-BIO** [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **PEREZ, Pascual** [FR/FR]; 17, chemin de la Pradelle, Varennes, F-63450 Chanonat (FR). **GERENTES, Denise** [FR/FR]; 48, route de la Roche Blanche, F-63450 Le Crest (FR). **PRAUD, Sébastien** [FR/FR]; 8, avenue Anatole France, F-63130 Royat (FR).

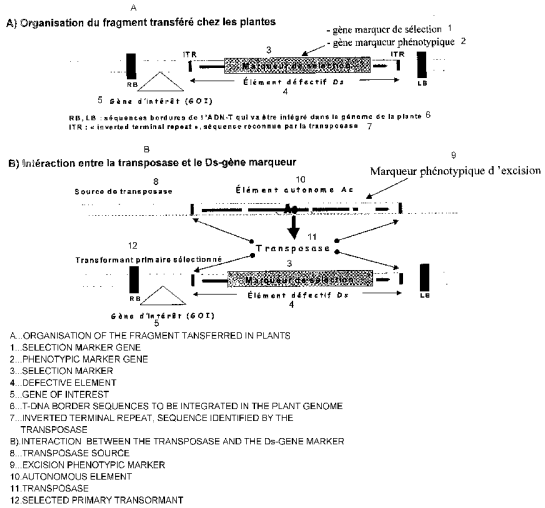
(74) Mandataire : **AVENTIS CORPSCIENCE S.A.**; Département Propriété Industrielle, 14-20, rue Pierre Baizet, B.P.9163, F-69263 Lyon (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A MONOCOTYLEDON PLANT CONTAINING A GENE OF INTEREST FREE OF FOREIGN ANCILLARY SEQUENCE

(54) Titre : METHODE D'OBTENTION DE PLANTE MONOCOTYLEDONE CONTENANT UN GENE D'INTERET SANS SEQUENCE AUXILIAIRE ETRANGERE



(57) **Abstract:** The invention concerns a method for obtaining a transgenic monocotyledon plant containing a gene of interest free of foreign ancillary sequences, comprising the following steps: a) transforming at least a plant cell free of active transposase, with a vector comprising two expression cassettes, one (i) including a nucleotide sequence of interest, the other (ii) including a nucleotide sequence coding for a selection marker framed by the mobilisable sequences of a transposon; b) selecting plants transformed with the selection marker (ii); cross-breeding a transformed plant with another plant belonging to a line containing in its genome a gene, coding for an endogenous active transposon, and which is in the middle of an excision phenotypic marker (iii) to obtain a F1 or any other individual of subsequent generation; d) selecting cells of individual carriers of the gene of interest free of foreign ancillary sequence, from the F1 generation; e) regenerating plants from the cells or individuals selected in (d).

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne une méthode d'obtention d'une plante Monocotylédone transgénique contenant un gène d'intérêt sans séquences auxiliaires étrangères, comprenant les étapes suivante: a) transformation d'au moins une cellule de plante ne possédant aucune transposase

[Suite sur la page suivante]

WO 02/101061 A3

LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés *(régional)* **:** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un brevet (règle 4.17.ii)) pour les désignations suivantes AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 4 décembre 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

active, avec un vecteur comprenant deux cassettes d'expression, l'une (I) comprenant une séquence nucléotidique d'intérêt, l'autre (ii) comprenant une séquence nucléotidique codant pour un marqueur de sélection encadré par les séquences mobilisables d'un transposon; b) sélection des plantes transformées avec le marqueur de sélection (ii); c) croisement d'une plant transformées avec une autre plante appartenant à une lignée contenant dans son génome un gène, codant pour une transposase active endogène, et qui se trouve au milieu d'un marqueur phénotypique d'excision (iii), pour obtenir une F1 ou tout autre individu de génération F1; e) régénération de plantes à partir des cellules ou des individus sélectionnés en (d).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/01656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 A01H5/00 A01H5/10 C12Q1/68

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 7 C12N A01H C12Q

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)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CAB Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 38323 A (PEREZ PASCUAL ;BIOCEM (FR); FLAMENT PASCAL (FR)) 3 September 1998 (1998-09-03) the whole document	1-3,6-8, 14-20
X	WO 92 01370 A (UNIV CALIFORNIA) 6 February 1992 (1992-02-06) cited in the application the whole document	1-3,6-8, 14-20
X	WO 91 02071 A (DEKALB PLANT GENETICS) 21 February 1991 (1991-02-21) cited in the application the whole document	14-16

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
23 May 2003	04/06/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Oderwald, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/01656

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 41228 A (GORDON KAMM WILLIAM ;PIERCE DORTOTHY A (US); PIONEER HI BRED INT () 6 November 1997 (1997-11-06) page 18 -page 19; claims 23-25; example 5 -----	14-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 02/01656

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9838323 A	03-09-1998	FR 2759857 A1	28-08-1998
		AU 6734998 A	18-09-1998
		EP 0972061 A2	19-01-2000
		WO 9838323 A2	03-09-1998
		HU 0001856 A2	28-09-2000
		PL 336300 A1	19-06-2000
		US 2002157129 A1	24-10-2002
WO 9201370 A	06-02-1992	US 5225341 A	06-07-1993
		AT 233819 T	15-03-2003
		AU 660620 B2	06-07-1995
		AU 8102291 A	18-02-1992
		CA 2318024 A1	20-01-1992
		DE 69133206 D1	10-04-2003
		EP 0577598 A1	12-01-1994
		JP 2659459 B2	30-09-1997
		JP 5508993 T	16-12-1993
		US 5482852 A	09-01-1996
		WO 9201370 A1	06-02-1992
		US 5792924 A	11-08-1998
WO 9102071 A	21-02-1991	AT 160174 T	15-11-1997
		AU 644097 B2	02-12-1993
		AU 6290390 A	11-03-1991
		BR 9007588 A	30-06-1992
		CA 2064761 A1	10-02-1991
		DE 69031711 D1	18-12-1997
		DE 69031711 T2	09-04-1998
		EP 0485506 A1	20-05-1992
		EP 0814166 A2	29-12-1997
		ES 2110417 T3	16-02-1998
		HU 60781 A2	28-10-1992
		JP 5501352 T	18-03-1993
		WO 9102071 A2	21-02-1991
		US 5489520 A	06-02-1996
		US 5969213 A	19-10-1999
		US 5874265 A	23-02-1999
		US 5919675 A	06-07-1999
		US 6399861 B1	04-06-2002
		US 5550318 A	27-08-1996
WO 9741228 A	06-11-1997	AU 730927 B2	22-03-2001
		AU 2998397 A	19-11-1997
		CA 2252412 A1	06-11-1997
		EP 0904371 A2	31-03-1999
		WO 9741228 A2	06-11-1997
		US 6486382 B1	26-11-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 02/01656

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/82 A01H5/00 A01H5/10 C12Q1/68

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 7 C12N A01H C12Q

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 réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CAB Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 38323 A (PEREZ PASCUAL ;BIOCEM (FR); FLAMENT PASCAL (FR)) 3 septembre 1998 (1998-09-03) le document en entier	1-3,6-8, 14-20
X	WO 92 01370 A (UNIV CALIFORNIA) 6 février 1992 (1992-02-06) cité dans la demande le document en entier	1-3,6-8, 14-20
X	WO 91 02071 A (DEKALB PLANT GENETICS) 21 février 1991 (1991-02-21) cité dans la demande le document en entier	14-16

-/--

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

[X] 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'appartenenant 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'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent; l'inven tion 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
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
23 mai 2003	04/06/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
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	Oderwald, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 02/01656

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 41228 A (GORDON KAMM WILLIAM ;PIERCE DORTOTHY A (US); PIONEER HI BRED INT () 6 novembre 1997 (1997-11-06) page 18 -page 19; revendications 23-25; exemple 5 -----	14-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 02/01656

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9838323	A	03-09-1998	FR	2759857 A1	28-08-1998
			AU	6734998 A	18-09-1998
			EP	0972061 A2	19-01-2000
			WO	9838323 A2	03-09-1998
			HU	0001856 A2	28-09-2000
			PL	336300 A1	19-06-2000
			US	2002157129 A1	24-10-2002
WO 9201370	A	06-02-1992	US	5225341 A	06-07-1993
			AT	233819 T	15-03-2003
			AU	660620 B2	06-07-1995
			AU	8102291 A	18-02-1992
			CA	2318024 A1	20-01-1992
			DE	69133206 D1	10-04-2003
			EP	0577598 A1	12-01-1994
			JP	2659459 B2	30-09-1997
			JP	5508993 T	16-12-1993
			US	5482852 A	09-01-1996
			WO	9201370 A1	06-02-1992
			US	5792924 A	11-08-1998
WO 9102071	A	21-02-1991	AT	160174 T	15-11-1997
			AU	644097 B2	02-12-1993
			AU	6290390 A	11-03-1991
			BR	9007588 A	30-06-1992
			CA	2064761 A1	10-02-1991
			DE	69031711 D1	18-12-1997
			DE	69031711 T2	09-04-1998
			EP	0485506 A1	20-05-1992
			EP	0814166 A2	29-12-1997
			ES	2110417 T3	16-02-1998
			HU	60781 A2	28-10-1992
			JP	5501352 T	18-03-1993
			WO	9102071 A2	21-02-1991
			US	5489520 A	06-02-1996
			US	5969213 A	19-10-1999
			US	5874265 A	23-02-1999
			US	5919675 A	06-07-1999
			US	6399861 B1	04-06-2002
			US	5550318 A	27-08-1996
WO 9741228	A	06-11-1997	AU	730927 B2	22-03-2001
			AU	2998397 A	19-11-1997
			CA	2252412 A1	06-11-1997
			EP	0904371 A2	31-03-1999
			WO	9741228 A2	06-11-1997
			US	6486382 B1	26-11-2002