

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 723 962**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **94 10298**

⑤1 Int Cl⁶ : C 12 N 15/86, 5/10, 15/54, A 61 K 48/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.08.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 01.03.96 Bulletin 96/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : UNIVERSITE PIERRE ET MARIE
CURIE PARIS VI ETABLISSEMENT PUBLIC — FR.

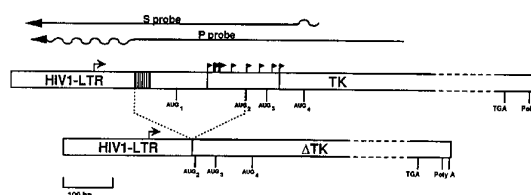
⑦2 Inventeur(s) : KLATZMANN DAVID et SALOMON
BENOIT.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : PLASSERAUD GUTMANN.

⑤4 HSV1-TK MODIFIEE FONCTIONNELLE.

⑤7 Vecteur recombinant porteur d'un gène codant pour
une kinase sous la dépendance d'un promoteur et apte,
quand il est exprimé dans des cellules transformées par le
dit vecteur, à phosphoryler des analogues de nucléosides
tels l'aciclovir ou le ganciclovir conduisant à la mort de la
cellule par blocage de la réplication, caractérisé en ce que
le gène codant pour une kinase est le gène de la thymidine
kinase du virus Herpès simplex de type 1 (HSV1-TK) dé-
lété dans sa partie 5' de tout ou partie de la séquence en
amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant
à la méthionine 46 de la protéine complète.



FR 2 723 962 - A1



HSV1-TK MODIFIEE FONCTIONNELLE

La présente invention est relative à un perfectionnement apporté
5 aux médicaments utilisés en thérapie génique par gène suicide, et en
particulier pour tous les médicaments utilisant le système d'expression
d'un gène de thymidine kinase dans des cellules infectées par un virus ou
dans des cellules cancéreuses, rendant lesdites cellules spécifiquement
sensibles à des analogues de nucléosides (A.N.), notamment le
10 ganciclovir (GCV) ou l'aciclovir (ACV).

Le gène de la thymidine kinase du virus Herpès simplex de type I
(HSV1-TK) a acquis une importance considérable dans les
développements de la thérapie antivirale ou anticancéreuse par utilisation
d'une toxicité conditionnelle et l'HSV1-TK est l'enzyme qui a été l'objet du
15 plus grand nombre d'investigations relatives aux gènes suicides.

Cette enzyme, atoxique pour les cellules eucaryotes, présente la
caractéristique de pouvoir transformer certains analogues nucléosidiques
tels l'ACV ou le GCV en molécules monophosphatées, ce dont sont
normalement incapables les kinases cellulaires (1,2). Ces nucléosides
20 monophosphatés sont ensuite convertis par des enzymes cellulaires en
nucléosides triphosphates qui sont utilisés lors de la synthèse de l'ADN et
bloquent le processus d'élongation entraînant ainsi la mort de la cellule.

D'autres thymidines kinases virales ayant les mêmes propriétés
peuvent également être utilisées, notamment celle du virus Zona Varicelle
25 (VZV) telles que décrite dans la demande de brevet EP 415 731. Dans
tout ce qui suit où il est fait référence à HSV1-TK, l'homme du métier
saura la généraliser aux enzymes équivalentes.

Cette toxicité conditionnelle de HSV1-TK a été d'abord démontrée
30 in vitro puis est maintenant utilisée in vivo à plusieurs fins dont :

- la thérapie génique par destruction de cellules malades :
cancéreuse ou infectées par des virus et notamment des rétrovirus
(4,7,8),
- l'ablation de types cellulaires spécifiques tels les cellules
35 lymphocytaires, ou des cellules sécrétrices d'hormones de croissance, ou
des cellules dendritiques (C.D.) (10) dans des lignées d'animaux
transgéniques ayant le gène HSV1-TK sous le contrôle de promoteurs
cellulaires spécifiques ; ce système est un moyen de recherche très

puissant pour connaître le rôle physiologique de l'un ou l'autre de ces types cellulaires.

En thérapie antivirale c'est la transactivation, sous l'effet d'une infection virale, d'un promoteur régulant la synthèse de HSV1-TK qui augmente la synthèse de la thymidine kinase, dont l'effet toxique se manifeste en présence d'un A.N.

On conçoit donc tous les avantages qui peuvent être tirés de l'utilisation de ce type de toxines conditionnelles appliquée à la thérapie génique, notamment anticancéreuse ou antivirale.

En premier lieu, seule une toxicité conditionnelle permet de générer des clones cellulaires stables produisant les pseudo-particules virales capables de produire un tel transgène et transférer le gène suicide dans les cellules cibles. Il suffit en effet de cultiver ces cellules en l'absence d'ACV ou de GCV puisque la thymidine kinase de l'HSV1 n'est pas toxique pour la cellule en absence de ces drogues.

Ensuite, en cas d'effet secondaire du traitement chez le patient, l'arrêt de l'administration de l'ACV ou du GCV fait cesser immédiatement la toxicité due au transgène ; en outre, un ajustement des doses de l'analogue nucléosidique permet de détruire sélectivement les cellules qui expriment fortement le transgène tout en préservant au maximum les cellules dans lesquelles le gène est faiblement exprimé. Enfin la toxicité restreinte aux cellules en division est un avantage important notamment pour le traitement des cellules cancéreuses.

Enfin, des données expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont montré que des cellules n'exprimant pas HSV1-TK, mais au contact de celles qui l'expriment étaient également détruites par le traitement par l'ACV ("Coopération métabolique" ou "effet bystander") (3, 4)

Le mécanisme de cet effet reste encore incompris, mais il est possible que les analogues nucléosidiques triphosphatés puissent passer d'une cellule à l'autre par l'intermédiaire des "gap junctions" ou communications intercellulaires.

Dans un transfert de gènes exogènes dans des cellules eucaryotes, notamment des cellules humaines, les rétrovirus apparaissent comme étant des vecteurs de choix. Cependant, un préalable indispensable pour leur utilisation à des fins thérapeutiques est de s'assurer de la sécurité de leur utilisation : la présente invention offre un moyen d'augmenter la sécurité du système sans diminuer l'index thérapeutique du traitement par un A.N. par administration de rétrovirus

recombinants contenant un gène codant pour la thymidine kinase, ledit gène étant modifié par délétion ou mutation dans sa partie 5' de telle façon que le gène exprime une activité kinase non toxique en présence de GCV si elle est exprimée faiblement et toxique si elle est exprimée
5 fortement.

L'index thérapeutique est défini comme le rapport des doses létales 50% (DL50) du traitement par les A.N. des cellules contenant le gène suicide de celles qui ne le contiennent pas ; dans certains cas, l'index thérapeutique peut être augmenté si les cellules exprimant le gène
10 suicide à faible niveau restent insensibles à l'effet toxique des A.N.

Dans le cas des cellules cancéreuses, la sécurité du système est apportée par l'utilisation de cellules d'emballage qui produisent uniquement des rétrovirus défectifs évitant ainsi la dissémination d'un
15 virus sauvage reconstitué dans la population cellulaire ou le tissu traité ; le développement de telles lignées cellulaires d'emballage a augmenté de façon considérable l'utilisation des rétrovirus en thérapie génique ; dans ce cas, le vecteur viral proprement dit conserve les séquences indispensables : les LTR pour le contrôle de la réverse transcription et de
20 l'intégration, la séquence ψ nécessaire à l'encapsidation, la séquence TB nécessaire à la répliquaison virale ; les gènes viraux (gag, pol, env) sont délétés et remplacés par le gène de la thymidine kinase placé sous la dépendance de son propre promoteur ou un promoteur jugé plus puissant, spécifique ou régulable. Les gènes viraux gag, pol, env sont souvent
25 intégrés dans un autre vecteur, parfois appelé Helper et défectif pour les séquences LTR et ψ . Leur expression permet l'encapsidation du transgène à l'exclusion des gènes nécessaires à la multiplication du génome viral et à la formation de particules virales complètes.

La forme provirale du Helper est en général intégrée dans le
30 génome d'une lignée cellulaire murine (par exemple la lignée fibroblastique NIH/3T3) qui joue à la fois un rôle d'hôte pour le vecteur et de Helper pour les fonctions qui lui font défaut. Après transfection du vecteur, la souche cellulaire devient capable de produire des particules virales infectieuses défectives. Cependant, ces particules ne contiennent
35 que le transgène (HSV1-TK) mais ne contiennent pas l'information nécessaire à la reconstitution de particules virales complètes dans les cellules cibles. Ce système est donc conçu pour empêcher normalement toute propagation ultérieure de virus après la première infection, c'est-à-

dire si le virus porteur du transgène pénètre dans une cellule dépourvue de l'information de type Helper (gag, pol, env), sa production est arrêtée.

Différents systèmes d'empaquetage permettant la production de virus recombinants défectifs susceptibles d'infecter des cellules en division ont été décrits, notamment dans les demandes de brevet
5 EP 0 243 204, WO 89/07150, WO 90/02806, WO 90/12087, EP 0 476 953, WO 93/04167 et WO 93/10218.

De même Caruso M. et al (8) et Yves Panis et col.(9), ont pu mettre en évidence un effet par injection directe de fibroblastes murins
10 produisant des particules rétrovirales recombinantes exprimant le gène HSV1-TK.

Enfin a été mis au point récemment un nouveau système qui permet l'expression d' un transgène dans une cellule cible ou un tissu humain ou animal, ce système étant caractérisé en ce qu'il est constitué
15 d'une cellule eucaryote établi en lignée dans laquelle ont été transfectées :

- d'une part, une séquence pseudo-rétrovirale recombinante dans laquelle le gène env a été délété dans sa totalité ou partiellement et substitué par ledit transgène au niveau du gène env, de sorte que le
20 transgène en question soit exprimé sur des transcrits similaires à ceux du virus sauvage, sauf que la protéine env est substituée par la protéine HSV1-TK,

-d'autre part, une séquence d'acide nucléique incluant une séquence codant pour une protéine d'enveloppe ou membranaire,
25 laquelle séquence est sous la dépendance d'un promoteur et est associée le cas échéant audit transgène et flanquée à son extrémité 3' par un site de polyadénylation,

le génome viral recombinant et la séquence d'acide nucléique incluant la séquence pour la protéine env étant susceptible de se compléter en
30 trans et permettre à la cellule hôte de produire des virus infectieux défectifs pourvus de la protéine d'enveloppe mais dépourvus du gène correspondant. Ce système, qui a fait l'objet de la demande de brevet FR 9401994 est particulièrement avantageux quand le transgène à exprimer est un gène suicide de type HSV1-TK. Ce système permet la production
35 dans un premier temps de particules virales infectieuses portant notamment le gène HSV1-TK mais elles-mêmes dépourvues du gène enveloppe, ceci conduisant à un cycle infectieux abortif dès la deuxième infection.

Une cible thérapeutique du système HSV1-TK/A.N. est constitué par les cellules infectées ou infectables par un virus notamment le rétrovirus VIH. Ces cellules sont, au contraire des cellules cancéreuses, des cellules qui se divisent peu et donc peu susceptibles d'être infectées directement et avec une bonne efficacité par un vecteur rétroviral ; les
5 cellules concernées sont alors infectées par une construction comportant le gène de la thymidine kinase sous le contrôle du LTR du HIV, cette construction étant elle-même incluse dans un rétrovirus recombinant qui en assure la transduction avec l'efficacité requise. Dans ce cas, les
10 cellules après infection par un rétrovirus tel le VIH produisent les signaux transactivateurs du LTR, entraînant l'expression du gène de la thymidine kinase et rendant les cellules sensibles aux A.N. administrés alors comme médicaments (5). Dans ce cas, c'est bien l'infection elle-même par le virus qui va déclencher l'expression du gène tueur et conférer à la cellule
15 une sensibilité particulière au ganciclovir ou l'aciclovir.

Il est capital dans l'un et l'autre cas que les gènes suicides, sous le contrôle de promoteur spécifique, soient régulés de telle façon que l'ensemble du traitement associant la transfection des cellules par le vecteur porteur du gène de la thymidine kinase et l'administration des
20 médicaments de type aciclovir ou ganciclovir n'affectera en aucun cas les cellules saines, et c'est le but de la présente invention d'ajouter un élément de sécurité complémentaire.

Dans le cas par exemple du traitement de l'infection par le VIH, le transgène devra être introduit dans les cellules souches
25 hématopoïétiques et exprimé, si possible, exclusivement dans les cellules différenciées qui en seront issues, en particulier les lymphocytes T, les monocytes et les cellules dendritiques. De plus, comme il a été vu plus haut, il sera nécessaire que ce gène ne soit activé qu'en présence d'une infection par le rétrovirus, de sorte que seules les cellules infectées soient
30 détruites par administration de GCV ou d'ACV. Cependant, il a été montré qu'en l'absence d'infection par le VIH, le LTR du VIH a toujours une expression basale faible mais réelle (6).

Cette expression basale peut être un problème avec certains gènes suicides et certains analogues nucléosidiques ; par exemple, des
35 cellules lymphoïdes qui expriment le gène HSV1-TK sous le contrôle du LTR de HIV expriment faiblement et de façon continue ce gène, ce qui ne permet pas d'utiliser le ganciclovir en tant qu'analogue de nucléostide car ce dernier s'avère beaucoup trop toxique. Au contraire, en ce qui

concerne l'aciclovir, cette drogue peut être utilisée à une concentration de 10 microMolaires qui respecte les cellules non infectées et qui permet de tuer les cellules infectées (7).

5 Cette expression basale de la thymidine kinase de HSV1 limite l'index thérapeutique de l'A.N. utilisé et il n'est pas possible, par utilisation de ce système, d'augmenter les concentrations d'aciclovir au-delà de 10 microMolaire, ce qui dans certains cas pourrait être hautement souhaitable.

10 L'effet «bystander» ou de coopération métabolique décrit plus haut pourrait avoir comme conséquence de rendre toxiques des A.N. pour des cellules voisines des cellules cibles, mais non visées initialement, et conférant des effets secondaires au traitement ; une des façons de diminuer cet effet « bystander » est d'inclure dans la construction un promoteur spécifique du tissu ou des cellules cibles du traitement.
15 Néanmoins, une expression résiduelle de la thymidine kinase peut subsister même sous la dépendance d'un promoteur hétérologue dans les tissus ou dans les cellules transfectées par le plasmide.

Dans ce type de situation, il est important que le gène suicide s'exprimant faiblement soit bien toléré au cours d'un traitement par
20 l'aciclovir ou la ganciclovir, mais qui, lorsque son expression est activée par exemple par transactivation lors d'une infection par HIV, s'avère aussi toxique que le gène HSV1-TK sauvage.

La présente invention est relative à un vecteur recombinant porteur d'un gène suicide sous la dépendance d'un promoteur et apte quand il est
25 exprimé dans des cellules transformées par ledit vecteur à phosphoryler des analogues de nucléosides telle l'aciclovir ou le ganciclovir conduisant à la mort de la cellule par blocage de la réplication, ledit vecteur étant caractérisé en ce que le gène suicide est le gène de la thymidine kinase du virus Herpès Simplex de type 1 (HSV1-TK) délété en sa partie 5' de
30 tout ou partie de la séquence en 5' en amont du deuxième codon ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète, en particulier lorsque que la délétion inclue tout ou partie du 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

La présente invention résulte de la découverte selon laquelle le
35 gène HSV₁-TK contient, entre les deux premiers codons ATG, un promoteur cryptique et plusieurs sites d'initiation de la transcription conduisant dans certaines situations à la synthèse de thymidine kinase fonctionnelle et tronquée dans sa partie N terminale.

Il a été montré en effet que des souris mâles transgéniques ayant le gène HSV1-TK comme transgène à toxicité conditionnelle pour détruire certaines catégories cellulaires et en étudier les effets, devenaient stériles, rendant impossible leur reproduction ; cette stérilité était dûe (données non publiées) à une hyper expression du gène du HSV1-TK dans les testicules accompagnée de la formation de transcrits plus courts et initiés dans la séquence codante de HSV1-TK. Des expériences ultérieures ont montré que ce promoteur cryptique au gène HSV1-TK était activé de façon spécifique dans les testicules conduisant à cette hyper production d'HSV-TK tronquée et néanmoins fonctionnelle.

Dans l'utilisation de plasmides porteurs de HSV1-TK comme gènes suicides en présence d' A.N. la toxicité conditionnelle de HSV1-TK dépend de la quantité aussi bien des analogues de nucléosides que de l'enzyme synthétisée par le gène HSV1-TK. Ce qui est surprenant dans la construction de l'invention c'est que non seulement elle permet d'exprimer, à partir du gène HSV1-TK tronqué, une activité de kinase mais qu'en outre cette activité permet de phosphoryler des analogues nucléosidiques comme l'aciclovir ou le ganciclovir, de la même façon que HSV1-TK, comme cela est démontré plus loin dans l'exemple 2.

Cette propriété de phosphorylation des analogues de nucléotides par la HSV1-TK tronquée (HSV1- Δ TK) a ceci de surprenant qu'elle ne se manifeste que dans le cas où l'expression, c'est-à-dire la transcription et la traduction du gène est forte. Par contre, si l'expression du gène est faible, alors l'enzyme résiduelle synthétisée est incapable de phosphoryler les analogues de nucléotides, contrairement à la protéine complète HSV1-TK.

Différentes modalités dans les traitements par thérapie génique ont déjà été décrites plus haut comme spécifiques de l'activation du gène ainsi transfecté aussi bien dans le cas de cellules infectées par HIV, où il s'agit d'une transactivation du gène LTR par le virus lui-même comme ceci a été décrit dans la demande de brevet PCT WO93/08844, que dans le cas de cellules cancéreuses, où l'activation proviendrait de la division anormale de cellules qui activerait un promoteur spécifique de cellules cancéreuses contrôlant le gène HSV1- Δ TK.

La construction de l'invention et notamment la nature du promoteur en 5' de la séquence codante HSV1-TK sera choisi en fonction de l'utilisation que l'on souhaite faire de la toxicité conditionnelle du gène HSV1- Δ TK en présence d'analogues de nucléosides ; par exemple, dans

le traitement de cellules infectées ou infectables par HIV, il sera choisi de préférence un promoteur de type LTR de HIV notamment HIV1 ou HIV2 comportant en 3' une séquence transactivable par TAT de type TAR tel que décrit dans le brevet WO 93/08844.

5 Si en revanche, l'on souhaite réaliser une thérapie génique de cellules cancéreuses, on pourra avantageusement utiliser un LTR issu du virus de Moloney et notamment des variantes Mov3 et/ou Mov9 et/ou Mov13 tel que décrit par Caruso et al. 1993 (8).

10 Ce qui est inattendu dans la construction de l'invention, c'est la double caractéristique du gène HSV1- Δ TK de :

- d'une part, exprimer une activité kinase capable de phosphoryler les analogues de nucléosides, tel l'ACV ou le GCV,
- et d'autre part, de ne présenter cette activité que quand la thymidine kinase tronquée est exprimée fortement ; exprimer fortement signifie qu'il y ait au moins une cinquantaine de transcrits par cellule.

15 Cette double propriété se retrouve quelque soit le vecteur dans lequel le gène est intégré et quelque soit le promoteur de transcription placé en 5' de ce gène.

20 La construction de l'invention comportant le gène HSV1- Δ TK peut être introduite dans toute lignée cellulaire d'emballage décrite dans l'état de la technique et notamment celui cité ci-dessus : ces lignées cellulaires d'emballage contenant une construction de l'invention sont susceptibles de transférer le principe actif d'une drogue toxique en présence d'analogues de nucléosides pour les cellules en division et

25 notamment les cellules cancéreuses. Les lignées cellulaires d'emballage transformées par un vecteur recombinant contenant le gène de la thymidine kinase portant une délétion en amont du 2^{ème} codon d'initiation ATG codant pour le méthionine en position 46 de la protéine entière font partie de l'invention.

30 Il en est de même des lignées cellulaires produisant un retrovirus dans lequel le gène env a été délété dans sa totalité, ou partiellement, et substitué par le HSV1- Δ TK et une séquence d'acides nucléiques incluant une séquence codant pour une protéine d'enveloppe, laquelle séquence est sous la dépendance d'un promoteur et est associée le cas échéant

35 audit transgène, et flanquée à son extrémité 3' un site de polyadénylation ledit génome viral recombinant et ladites séquence étant susceptibles de se compléter en trans et permettre à ladite cellule hôte de produire des virus infectieux dépourvus du gène env, le tout formant un système

hôte vecteur qui pourrait être injecté en tant que tel au niveau de cellules tumorales.

La séquence pseudovirale recombinante contenue dans la lignée cellulaire peut être dérivée d'un génome de Moloney MuLV ou de celui d'un virus HIV.

Dans le cas de traitement de cellules qui se divisent peu mais susceptibles d'être infectées par un virus, notamment des cellules hématopoïétiques, lesdites cellules pourront être transfectées par une construction contenant une séquence HSV1- Δ TK, sous la dépendance d'un promoteur spécifique du virus susceptible d'infecter lesdites cellules, par exemple le HIV et les lymphocytes T, la construction comprenant en outre un gène transactivable par TAT, provoquant l'activation du promoteur et de la transcription du gène en présence d'un virus infectieux. La population de cellules, notamment hématopoïétiques et contenant le type de construction de l'invention, font également partie de l'invention.

La caractéristique citée plus haut de la construction contenant HSV1- Δ TK de phosphoryler les analogues de nucléosides quand la transcription est activée et de ne pas les phosphoryler lorsque l'expression est faible, a pour conséquence que dans ce dernier cas, les cellules exprimant ledit gène suicide sont insensibles aux A.N et notamment le GCV à des doses comprises entre 0 et 10 microMolaire, alors qu'après transactivation les cellules sont sensibles à des doses comprises entre 10^{-2} et 10^{-1} microMolaire de GCV. Les populations de cellules qui peuvent être ainsi transfectées et contenir les constructions de l'invention, peuvent être :

- soit des cellules de la lignée lymphocytaire infectables notamment par un HIV, auquel cas le promoteur pourra être un LTR de HIV,
- soit des lymphocytes T, le promoteur susceptible d'être transactivé pouvant être un promoteur de cytokine,
- soit encore les cellules souches de moëlle osseuse.

L'invention est également relative à :

- l'utilisation pour la production des médicaments destinés à la prévention ou au traitement de maladies induites par des virus, notamment des rétrovirus pathogènes ayant un tropisme spécifique pour certains types de cellules notamment hématopoïétiques, d'une construction porteuse d'un gène suicide sous la dépendance d'un promoteur spécifique transactivable caractérisé en ce que ledit gène suicide est le gène de la thymidine kinase de HSV1-TK délété de tout ou

partie de la séquence en 5' en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète, en particulier lorsque que la délétion inclue tout ou partie du 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1, ledit vecteur rétroviral étant introduit
5 par tout moyen approprié dans lesdites cellules ;

- l'utilisation pour la production de médicaments actifs pour induire une tolérance à des antigènes et prévenir ou traiter un rejet de greffe par thérapie génique d'une construction recombinante porteuse d'un gène HSV1- Δ TK ;

10 - l'utilisation pour la production de médicaments destinés au traitement par thérapie génique du cancer d'une construction recombinante appropriée porteuse du même gène HSV1- Δ TK ;

- l'utilisation de ce type de construction pour générer des souris transgéniques exprimant l'activité HSV1-TK mais, du fait de la délétion
15 dans la région 5' du gène, l'activation spécifique observée dans les animaux transgéniques au niveau de leurs testicules rendant ces animaux stériles est supprimée du fait de la délétion de la région concernée.

L'invention est relative à un procédé de préparation d'un vecteur viral recombinant porteur d'un gène suicide sous la dépendance d'un
20 promoteur spécifique transactivable, la toxicité du produit du gène en présence d'analogues de nucléosides dépendant de ladite transactivation, caractérisé en ce que le gène suicide est un gène de la thymidine kinase de HSV1 (HSV1-TK) délété dans sa partie 5' de tout ou partie de la séquence en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à
25 la méthionine 46 de la protéine complète, en particulier lorsque que la délétion inclue tout ou partie du 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

Enfin, l'invention est relative au gène même de la thymidine kinase de HSV1-TK tronqué dans sa région 5' de tout ou partie de la séquence
30 en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète, en particulier lorsque que la délétion inclue tout ou partie du 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1 et susceptible de conserver une activité de phosphorylation des analogues de nucléosides et présentant une toxicité
35 conditionnelle en présence de GCV au-dessus de 10 microMolaire d'analogues, quand ledit gène est faiblement exprimé et présentant une toxicité conditionnelle entre 10^{-2} et 10^{-1} microMolaire de A.N., essentiellement le GCV lorsque le gène est activé.

Les expériences ci-après permettront d'illustrer dans différents cas cette surprenante capacité du gène de la thymidine kinase de HSV1 tronqué et permettront, à l'aide des figures, de montrer la supériorité de l'utilisation du gène de la HSV1- Δ TK en lieu et place de HSV1-TK à
5 chaque fois qu'un risque de toxicité résiduelle peut conduire le praticien à rejeter l'utilisation du gène complet, lorsqu'il estime que le rapport risque/bénéfice n'est pas en faveur du traitement pour une pathologie donnée.

10 BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

La figure 1a est une représentation de la construction de l'invention comportant en 5' le LTR de HIV et comportant en aval et dans la direction 5' \rightarrow 3' la séquence TAR (inductible par TAT) de HIV et le gène de HSV1-TK.

15 La figure 1b représente la construction de l'invention déletée de la région en amont du 2ème codon ATG.

La figure 2 représente la toxicité de doses croissantes de ganciclovir sur des cellules exprimant le gène HSV1-TK ou HSV1- Δ TK sous le contrôle du LTR-HIV (LTR-TK ou LTR- Δ TK) en absence ou
20 présence de Tat. L'indication C1 indique que le 1er clone de la lignée cellulaire a été utilisé, C2 se référant à un 2ème clone et « bulk » à un mélange ou à la lignée non clonée.

La figure 3 représente les profils obtenus par FPLC des différentes formes phosphorylées du GCV, après transfection cellulaire par une
25 construction comprenant le HSV1-TK (figure 3a), une construction HSV1- Δ TK n'ayant pas été transactivée et donc ayant été faiblement exprimée (3b), et une construction HSV1- Δ TK transactivité par Tat (figure 3c).

La figure 4 représente la sensibilité au ganciclovir de cellules de moëlle osseuse traitées au GM-CSF et préalablement transfectées par
30 une construction comportant HSV1-TK (carrés noirs) ou HSV1- Δ TK (- Δ Tk40 et - Δ TK72) sous le contrôle du LTR-HIV.

MATERIELS ET METHODES

a) Construction :

Tous les clonages et sous-clonages ont été réalisés en utilisant les
35 techniques habituelles telles que décrites dans Maniatis et al (1989 Molecular cloning laboratory, Coldspring Harbour Laboratory, Coldspring Harbour NY).

Le gène HSV1-TK ou le gène HSV1- Δ TK ont été intégrés dans un plasmide sous le contrôle du 5' LTR de HIV selon le protocole expérimental décrit par Caruso et al 1992 (7). Le LTR présente deux caractéristiques remarquables :

- 5 - d'être un promoteur faible dans nos conditions expérimentales,
- d'être facilement transactivable par la protéine Tat.

Pour la construction du plasmide p LTR- Δ TK, une séquence Δ TK est amplifiée par PCR en utilisant comme matrice le gène TK. Le couple d'amorces utilisé pour l'amplification PCR est le suivant :

- 10 a) l'oligonucléotide en 5' de séquence :

5'CCGAATTCAAGCTTATGCCACGCTACTGCCGG3' contient un site Eco R1 et un site HindIII, collé à la séquence en aval du 2ème codon ATG d'initiation de TK indiqué en gras ;

- b) l'oligonucléotide en 3' de séquence

- 15 5'CCGGATCCACCCGTGCGTTTTATTCTGTCT3' contenant le site Bam HI, collé à la séquence entourant le second site de polyadénylation de TK lui-même indiqué en gras. Un fragment PCR de 1,05 Kb est ensuite digéré avec HindIII et Bam HI et ligué en aval de la séquence HIV LTR du plasmide p LTR-TK délété de sa séquence TK par une digestion par
20 HindIII et Bam HI. Le plasmide rétroviral pNCTat a été construit par insertion du fragment cDNA obtenu par digestion par Bam HI du fragment Tat du plasmide pCV-1 comme décrit par Arya et al (12) en aval d'un promoteur immédiat précoce de cytomégalovirus du vecteur pNC. Ce dernier possède le gène de la néomycine et le promoteur
25 cytomégalovirus entre les deux LTR du virus de Moloney MLV.

Le plasmide peut également contenir en 3' du LTR le gène TAR de HIV.

- 30 Les constructions utilisées seront choisies en fonction de l'utilisation que l'on souhaite faire de la toxicité du gène suicide. Dans l'utilisation comme anticancéreux on utilisera de préférence le plasmide pMTK tel que décrit dans Caruso et al. 1993 (8).

L'homme du métier saura au cas par cas choisir le système hôte vecteur qui lui convient et sont intégrés ici par référence tous les types de constructions de HSV1-TK cités ci-dessus dans l'état de la technique.

- 35 b) Délétion de la partie 5' du gène HSV1-TK pour l'obtention de HSV1- Δ TK

La délétion représentée dans la figure 1 et explicitée ci-dessus est faite par action des enzymes de restriction HindIII et Bam HI.

c) Evaluation de la taille du fragment de HSV1-TK contenant un promoteur cryptique, et dont l'ablation permet de réaliser la construction de l'invention.

La présence d'un promoteur cryptique dans la séquence codant de HSV1-TK a été initialement suggérée par une analyse en Northern Blot ; dans les expériences de transfection avec un gène HSV1-TK dépourvu de promoteur puis sélection selon le critère d'obtention d'une protéine fonctionnelle, Roberts et al (13) ont détecté deux transcrits de 1,1 Kb et de 0,9 Kb. Par ailleurs Al Shawi et al (14) a détecté des transcrits dans les testicules de souris transgéniques portant le gène HSV1-TK.

La technique utilisée par les demandeurs du brevet est la technique de RPA pour "RNase Protection Assay", laquelle technique a permis d'analyser la présence et la longueur des transcrits courts après activation du promoteur cryptique, par hybridation avec une sonde ARN préalablement établie comme indiquée ci-dessous puis traitement à la RNase tel que décrit dans Salomon et al 1994 (10).

La première sonde utilisée, appelée S ribosonde sur la figure 1, a été décrite dans Salomon et al (10) ;

La deuxième sonde, appelée ribosonde P dans la figure 1, a été obtenue de la façon suivante ; un fragment de restriction BglIII-SacI de la thymidine kinase HSV1-TK a été intégrée dans le plasmide PGEM3Z commercialisé par la société Promega ; le PGEM-TK a ensuite été linéarisé par l'enzyme PvuII puis l'ARN polymérase T7 a été utilisée sur le PGEM-TK, linéarisé pour donner finalement la ribosonde P.

d) Culture cellulaire et transfection.

La culture des cellules L et la transfection desdites cellules a été effectuée selon les techniques décrites dans Salomon et al (10).

e) Prolifération cellulaire et essais de viabilité.

La mesure de la prolifération cellulaire et de la viabilité des cellules après transfection par les plasmides contenant HSV1-TK ou HSV1- Δ TK puis traitement par l'analogue de nucléosides a été réalisée par comptage des cellules vivantes qui excluent le bleu trypan.

Exemple 1 : Sensibilité au ganciclovir de cellules L transfectées par une construction contenant HSV1- Δ TK.

Les constructions portant le LTR- Δ TK, ou le LTR-TK contrôle, ont d'abord été transfectées dans des cellules L déficientes en thymidine kinase cellulaire et sélectionnées par la présence d'une thymidine kinase fonctionnelle par sélection au HAT.

Des clones de cellules transfectées par LTR-TK poussent normalement dans le milieu de sélection alors que les clones de cellules transfectées par LTR- Δ TK apparaissent transitoirement puis meurent pendant la deuxième semaine en milieu sélectif.

5 Les cellules L déficientes en thymidine kinase cellulaire ont été à nouveau co-transfectées avec un plasmide exprimant l'hygromycine et la construction LTR- Δ TK. Les différents clones ont été sélectionnés dans un milieu contenant de l'hygromycine.

Le clone C1 transfecté de façon stable par LTR- Δ TK a ensuite été
10 infecté par un rétrovirus exprimant la protéine TAT de HIV qui transactive le LTR de HIV en 5' du Δ TK, puis on opère une sélection en HAT.

Différents clones ont ainsi été sélectionnés puis testés pour leur sensibilité au ganciclovir.

Dans la figure 2 on peut voir que la dose inhibitrice 50% (ID50) du
15 GCV est 20 μ M pour les cellules L parentales et 0,02 μ M pour les clones LTR-TK C1 et C2.

La ID50 du clone LTR- Δ TK (C1) est de 20 μ M à savoir la même sensibilité au GCV que les cellules parentales alors que la ID50 de deux clones testés LTR- Δ TK + TAT est entre 0,03 et 0,08 μ M.

20 On peut donc déduire de cette figure que la thymidine kinase tronquée a la même efficacité que la thymidine kinase normale lorsque le gène est activé (LTR- Δ TK + TAT), alors qu'à un faible niveau d'expression, c'est-à-dire sans transactivation par TAT, le niveau de sensibilité au ganciclovir est identique à celui trouvé dans les cellules
25 témoins dépourvues du gène TK ou Δ TK.

Exemple 2 : Analyse par FPLC du degré de phosphorylation du ganciclovir.

La figure 3 montre les profils obtenus après chromatographie par
30 FPLC (Pharmacia) des lysats de cellules L transfectées soit par LTR-TK (figure 3a), soit par LTR- Δ TK (figure 3c) ou par LTR- Δ TK + TAT (figure 3b)

L'observation de la figure indique que les profils de chromatographie sont similaires dans les deux premiers cas (3a et 3b), c'est-à-dire que en présence d'une transactivation du gène tronqué
35 l'activité de phosphorylation de la thymidine kinase tronquée est semblable à celle de la thymidine kinase non tronquée : les pourcentages respectifs de GCV, GCV monophosphate, diphosphate et triphosphate sont comparables.

Au contraire, en l'absence de transactivation le gène LTR- Δ TK est faiblement exprimé et le lysat cellulaire ne contient que du GCV, à l'exclusion des formes phosphorylées.

Exemple 3 : Transfection du gène LTR- Δ TK dans des lignées de souris.

treize lignées transgéniques portant le LTR- Δ TK ont été réalisées, les mâles de toutes ces lignées étant fertiles et transmettant le transgène à leur descendance selon une transmission mendélienne.

Aucun transcrite HSV1- Δ TK n'a pu être détecté par le test RPA décrit ci-dessus.

Six des huit lignées transgéniques analysées quant à l'expression du transgène ont un niveau significatif de transcrits LTR- Δ TK dans la peau, lequel est comparable au niveau de transcrits TK dans les souris transgéniques LTR-TK décrits précédemment (10).

La fonctionnalité de cette expression de la thymidine kinase tronquée a été testée quant à la possible déplétion en cellules dendritiques dans lesdites souris transgéniques.

Des cellules de la moëlle osseuse ont été cultivées en présence de GM-CSF pendant 6 jours, ce qui permet de générer des cellules dendritiques prolifératives.

Ont été comparées dans la figure 4 les sensibilités au GCV des cellules dendritiques de moëlle osseuse provenant de souris transgéniques soit porteuses de LTR-TK, soit porteuses de LTR- Δ TK; les résultats obtenus avec les lignées transgéniques 40 et 72 portant LTR- Δ TK y sont représentés.

La ID50 est de 40 μ M pour les souris non transgéniques, de 0,035 μ M pour les lignées transgéniques comportant le gène complet LTR-TK, de 2 μ M pour la lignée transgénique LTR- Δ TK 72 et de 20 μ M pour la lignée LTR- Δ TK 40.

Du GCV a été administré en outre à des souris de 12 lignées transgéniques différentes : la dose de 20 à 30 mg par kilo et par jour qui a été utilisée pour l'ablation des cellules dans la lignée transgénique LTR-TK 14 n'a aucun effet sur la lignée LTR- Δ TK ; seules les hautes doses de GCV (80 à 100 mg par kilo et par jour) non toxiques pour les souris non transgéniques ont un effet modéré sur 6 de ces lignées.

Les cellules dendritiques sont partiellement déplétées puisqu'elles représentent 0,5 à 0,8% des splénocytes ; ceci est à comparer au 1,5% obtenu avec des souris non transgéniques.

L'ensemble de ces expériences montre que les cellules exprimant des faibles doses de HSV1-TK restent sensibles à l'effet toxique du GCV alors que les cellules exprimant le HVS1- Δ TK à faible dose ne sont pas sensibles au GCV.

5 Tout l'avantage des constructions de l'invention apparaît bien grâce aux expériences ci-dessus, notamment en ce qui concerne la sécurité et la diminution des risques de ce type de traitement pour les patients, puisque seule une situation de transcription active du gène confère au gène suicide sa toxicité conditionnelle. Dans le cas d'une
10 faible expression (ou non transactivation du promoteur), le gène tronqué est incapable de phosphoryler les analogues de nucléotides et donc ils ne présentent aucune toxicité pour les cellules, même en présence de ces analogues.

15 La thérapie génique par gène suicide peut alors être envisagée dans le cas où l'évaluation risque/bénéfice deviendrait défavorable avec l'utilisation du gène complet.

REFERENCES

- 5
- (1) **Furman** et al (1980) *Virology* 102 : 420-430.
 - (2) **St Clair** et al (1987) *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 31 : 844-849
 - (3) **Moolten** F.L. (1986) *Cancer Research*, 46:5276-5281. .
 - (4) **Culver** K.W. et al. (1992) *Science* 256:1550-1552)
 - 10 (5) **Venkatesh** et al (1990) - *Proc. natl. acad. sciences 1990* 87 : 8746-8750
 - (6) **M. Muesing** et al; (1987) *Tat* , 48 : 691-701.
 - (7) **Caruso** et al (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 : 182
 - (8) **Caruso** et al (1993). *proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90 : 7024-7028
 - 15 (9) **Panys** Y et al (1992) *C.R. Acad Sci. Paris*, t. 315 série III p 541-543
 - (10) **Salomon** B et al (1994) *J. of Immunol.* 152 :. 537-548
 - (11) **Elion** G.B. et al (1983) *J. Antimicrobi Chemother* 12 : 9-17
 - (12) **Arya** et al (1985) *Science* 229 : 69-73
 - (13) **Roberts** et al (1982) *Cell* 29 : 109-119
 - 20 (14) **Al-Shawi** et al (1991) *Mol. Cel. Biol.* 11 : 4207-4216

REVENDEICATIONS

1. Vecteur recombinant porteur d'un gène codant pour une kinase
5 sous la dépendance d'un promoteur et apte, quand il est exprimé dans
des cellules transformées par ledit vecteur, à phosphoryler des analogues
de nucléosides tels l'aciclovir ou le ganciclovir conduisant à la mort de la
cellule par blocage de la réplication, caractérisé en ce que le gène codant
pour une kinase est le gène de la thymidine kinase du virus Herpès
10 simplex de type 1 (HSV1-TK) délété dans sa partie 5' de tout ou partie de
la séquence en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant
à la méthionine 46 de la protéine complète.

2. Vecteur recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce
que la délétion en 5' du gène de HSV1-TK inclue tout ou partie du 1er
15 codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

3. Vecteur recombinant selon la revendication 1 ou 2, caractérisé
en ce que la construction est un vecteur retroviral notamment issu du HIV
ou du MoMuLV.

4. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce
20 que le promoteur est un LTR de HIV, notamment HIV1 ou HIV2.

5. Vecteur selon la revendication 1 à 3, caractérisé en ce que le
promoteur est un LTR issu du virus de Moloney et notamment des
variantes MOV3, et/ou MOV9 et/ou MOV13.

6. Lignée cellulaire d'empaquetage, caractérisée en ce qu'elle est
25 transformée par un vecteur viral recombinant selon l'une des
revendications 1 à 5.

7. Lignée cellulaire transfectée :

a) par une séquence pseudovirale recombinante dans laquelle le gène
env a été substitué par un gène suicide ;

30 b) par une séquence d'acides nucléiques incluant une séquence codant
pour une protéine d'enveloppe, laquelle séquence est sous la
dépendance d'un promoteur et est associée le cas échéant audit
transgène, et flanqué à son extrémité 3' un site de polyadénylation ledit
génom viral recombinant et ladites séquence étant susceptibles de se
35 compléter en trans et permettre à ladite cellule hôte de produire des
virus infectieux dépourvus du gène env,

et caractérisée en ce que le gène suicide est un gène de la thymidine
kinase de HSV1 délété dans sa partie 5' de tout ou partie de la séquence

en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète.

8. Lignée cellulaire transfectée selon la revendication 6 caractérisée en ce que la délétion en 5' du gène de HSV1-TK inclue tout ou partie du
5 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

9. Lignée cellulaire selon la revendication 7, caractérisée en ce que la séquence pseudovirale recombinante est dérivée du génome de Moloney MuLV ou du génome de HIV.

10. Population de cellules, notamment hématopoïétiques,
10 contenant une séquence codant pour un gène suicide dont le produit d'expression, normalement faiblement exprimé peut, lorsque sa production est accrue par transactivation du promoteur, réagir avec une substance pour former un produit conduisant à la destruction desdites cellules, et caractérisées en ce que le gène suicide est le gène de la
15 thymidine kinase de HSV1 délété de tout ou partie de la séquence en 5' en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète, ladite délétion étant telle que en l'absence de transactivation, les cellules exprimant faiblement ledit gène suicide sont insensibles aux analogues de nucléostides à des doses
20 comprises entre 10^{-2} et $10 \mu\text{M}$, et après transactivation les cellules y sont sensibles à des doses comprise entre 10^{-2} et $10^{-1} \mu\text{M}$ sur le GCV et 1 à $10 \mu\text{M}$ pour l'ACV.

11. Population de cellules selon la revendication 9 caractérisée en ce que la délétion en 5' du gène de HSV1-TK inclue tout ou partie du 1er
25 codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

12. Population de cellules selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce que la HSV1-TK tronquée a la propriété à la fois de ne pas métaboliser le ganciclovir quand il est faiblement exprimé et de phosphoryler efficacement le ganciclovir quand sa synthèse est activée
30 notamment par l'infection par un rétrovirus.

13. Population de cellules selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'il s'agit de cellules du système hématopoïétique, notamment les lymphocytes T, et en ce que le promoteur susceptible d'être activé est un LTR de HIV.

35 14. Population de cellules selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'il s'agit de cellules du système hématopoïétique, notamment les lymphocytes T, et ce que le promoteur susceptible d'être transactivé est un promoteur de cytokine (ou récepteur de cytokine).

15. Population de cellules selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'il s'agit de cellules de moelle osseuse.

16. Procédé de préparation d'un vecteur viral recombinant porteur d'un gène suicide sous la dépendance d'un promoteur spécifique transactivable, la toxicité du produit du gène en présence d'analogues de nucléosides est dépendant de ladite transactivation, caractérisé en ce que le gène suicide est un gène de la thymidine kinase de HSV1 (HSV1-TK) délété dans sa partie 5' de tout ou partie de la séquence en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète.

17. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que la la délétion en 5' du gène de HSV1-TK inclue tout ou partie du 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

18. Utilisation pour la production de médicaments destinés à la prévention ou au traitement des maladies induites par des virus, et notamment des rétrovirus pathogènes ayant un tropisme spécifique pour certains types de cellules, notamment hématopoïétiques, d'un vecteur recombinant porteur d'un gène suicide sous la dépendance d'un promoteur spécifique transactivable, caractérisé en ce que ledit gène suicide est le gène de la thymidine kinase de HSV1 (HSV1-TK) délété de tout ou partie de la séquence en 5' en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète, ledit vecteur rétroviral étant introduit par tout moyen approprié dans lesdites cellules.

19. Utilisation pour la production de médicaments actifs pour induire une tolérance à des antigènes et prévenir ou traiter un rejet de greffe par thérapie génique, d'une construction recombinant porteur d'un gène suicide sous la dépendance d'un promoteur spécifique transactivable, caractérisé en ce que ledit gène suicide est le gène de la thymidine kinase de HSV1 (HSV1-TK) délété dans sa partie 5' de tout ou partie de la séquence en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète, ledit vecteur rétroviral étant introduit par tout moyen approprié dans les cellules responsables de la réaction immunitaire de rejet.

20. Utilisation pour la production de médicaments destinés au traitement par thérapie génique du cancer d'une construction recombinante appropriée porteur d'un gène suicide sous la dépendance d'un promoteur spécifique transactivable, caractérisé en ce que ledit gène

suicide est le gène de la thymidine kinase de HSV1 (HSV1-TK) délété dans sa partie 5' de tout ou partie de la séquence en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète, ledit vecteur rétroviral étant introduit par tout moyen approprié dans les cellules tumorales.

21. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 20 caractérisé en ce que la délétion en 5' du gène de HSV1-TK inclue tout ou partie du 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

22. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que le gène HSV1-TK délété est sous la dépendance d'un promoteur spécifique activable en trans directement ou indirectement par une substance exogène, de telle façon que en l'absence d'une telle activation, la population de cellules porteuses dudit gène est insensible à l'addition d'analogues de nucléosides et en présence d'une telle activation conduisant à une production accrue du produit du gène suicide, et est toxique pour la population de cellules porteuses du gène.

23. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 22, caractérisée en ce que le produit du gène HSV1-TK délété est capable de phosphoryler les analogues de nucléotides, notamment le ganciclovir et l'aciclovir.

24. Gène de la thymidine kinase de HSV1 caractérisé en ce qu'il contient une délétion de tout ou partie de la séquence en 5' en amont du deuxième codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine 46 de la protéine complète.

25. Gène selon la revendication 24 caractérisé en ce que la délétion en 5' du gène de HSV1-TK inclue tout ou partie du 1er codon d'initiation correspondant à la méthionine n° 1.

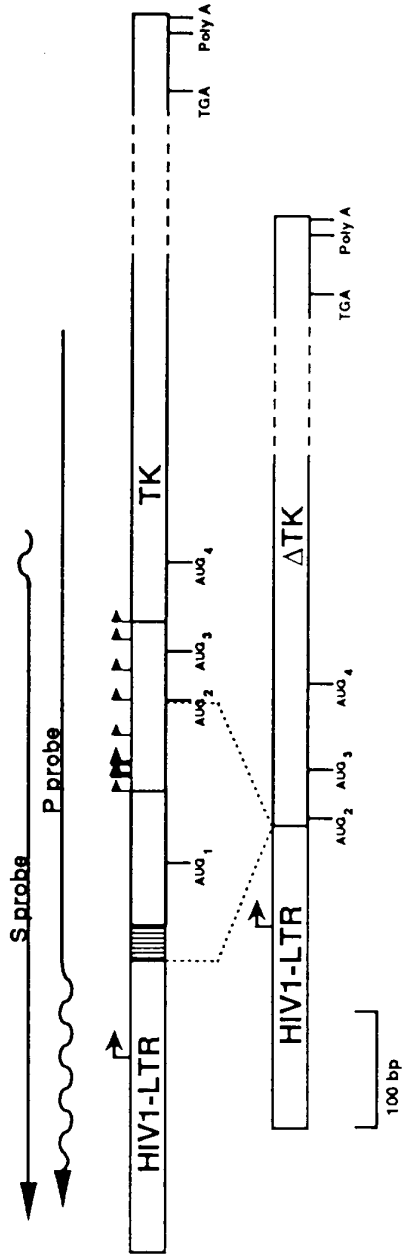


Fig. 1a

Fig. 1b

Figure 1

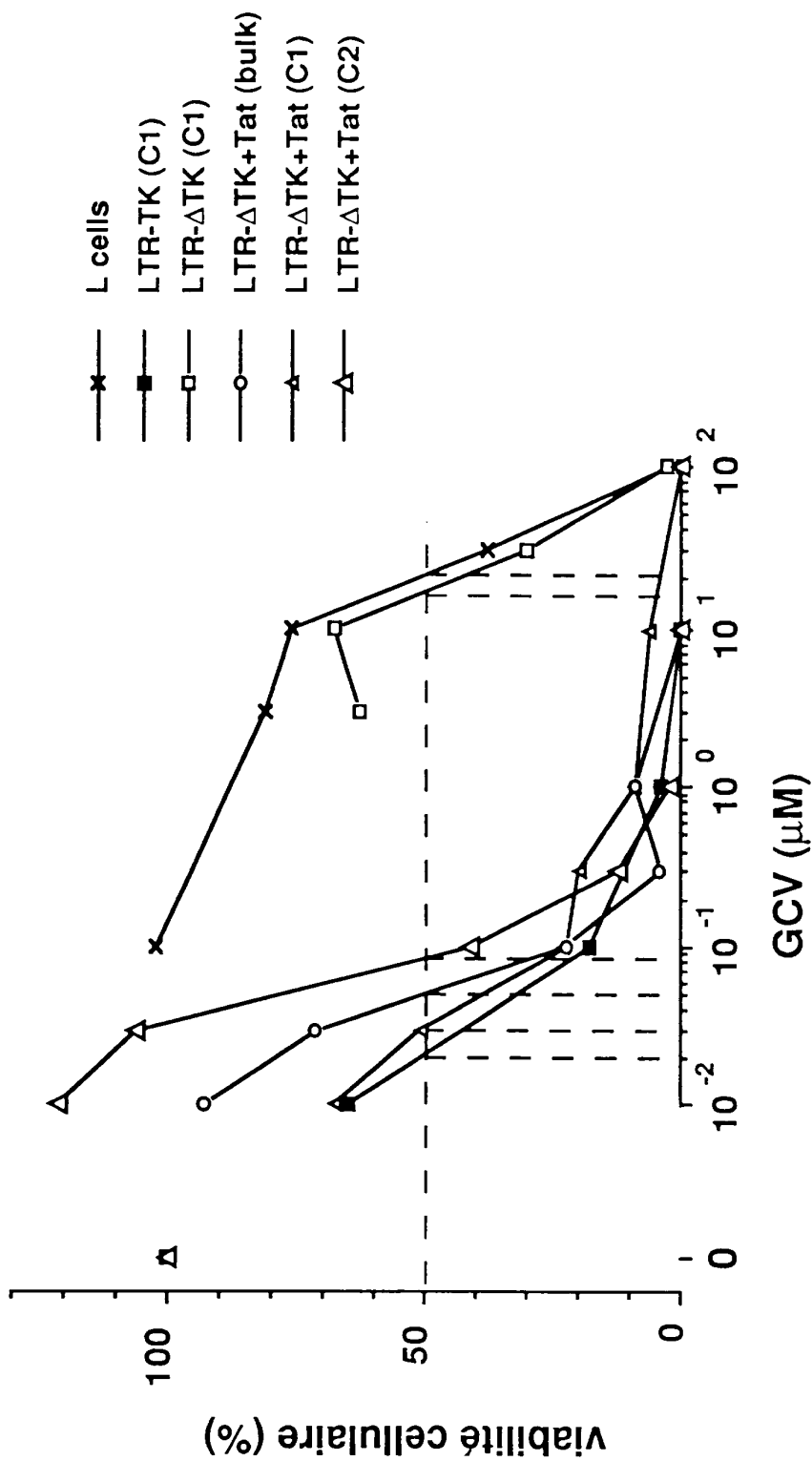


Figure 2

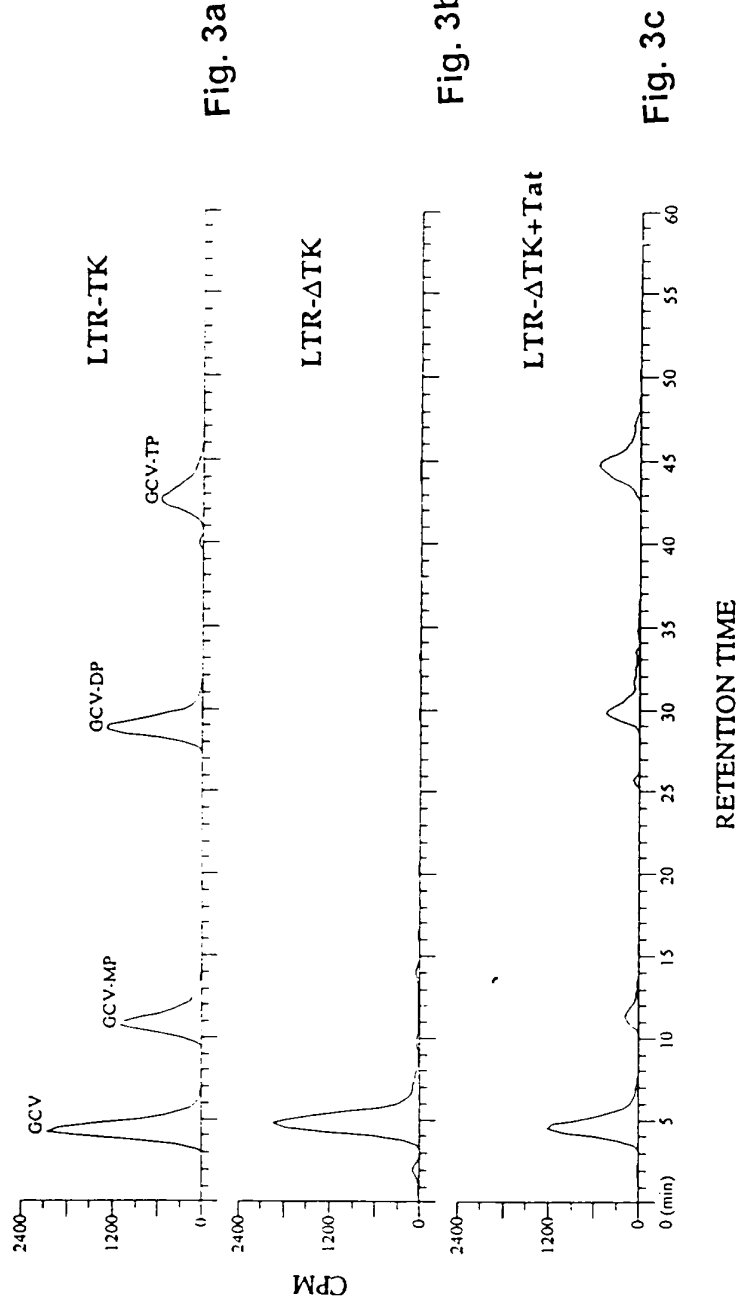


Figure 3

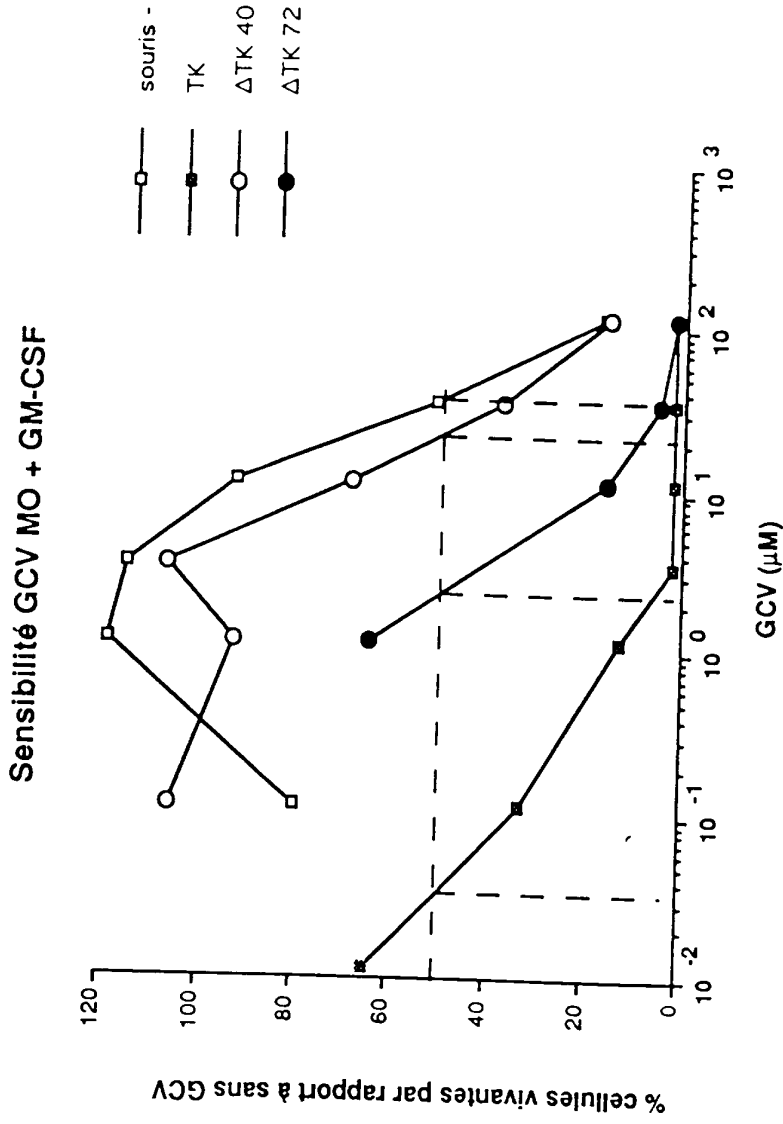


Figure 4

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2723962
N° d'enregistrement
national

FA 503236
FR 9410298

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-94 13824 (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)) * le document en entier * ---	1
A	EP-A-0 494 776 (UNIVERSITY OF EDINBURGH) * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
		C12N C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 Mai 1995		Chambonnet, F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 1503 03.82 (POMC13)