



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2004/10/19
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2005/05/06
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 2006/04/19
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2004/002673
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2005/040385
 (30) Priorité/Priority: 2003/10/20 (FR0312250)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/63* (2006.01),
C12N 5/10 (2006.01), *A61K 31/713* (2006.01),
C12N 15/11 (2006.01)

(71) Demandeur/Applicant:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
HAREL-BELLAN, ANNICK, FR;
AIT-SI-ALI, SLIMANE, FR;
BENKIRANE, MONSEF, FR

(74) Agent: GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) Titre : METHODE D'INDUCTION D'UNE ACTIVITE ARNI SPECIFIQUE DANS DES CELLULES ET ACIDES
NUCLEIQUES POUR SA MISE EN OEUVRE

(54) Title: METHOD FOR INDUCING A SPECIFIC RNAI ACTIVITY IN CELLS AND NUCLEIC ACIDS FOR CARRYING
OUT SAID METHOD

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention a pour objet une méthode d'induction d'une activité d'un ARNi spécifique dans des cellules eucaryotes dans lesquelles on introduit la protéine TAT et un acide nucléique codant pour une séquence nucléotidique comprenant les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique séparatrice codant pour une séquence comprenant au moins la séquence TAR minimale reconnue par la protéine TAT, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant un complexe inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt et on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.



(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
6 mai 2005 (06.05.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/040385 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/63, 15/11, 5/10, A61K 31/713(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/002673(22) Date de dépôt international :
19 octobre 2004 (19.10.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0312250 20 octobre 2003 (20.10.2003) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : HAREL-BELLAN, Annick [FR/FR]; 50, boulevard Saint-Germain, F-75005 Paris (FR). AIT-SI-ALI, Slimane [FR/FR]; 36, rue de la Chapelle, F-94800 Villejuif (FR). BENKIRANE, Monsef [MA/FR]; 2, rue Cap de Viele, F-30260 Quissac (FR).

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breesé-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), 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

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.

(54) Title: METHOD FOR INDUCING A SPECIFIC RNAI ACTIVITY IN CELLS AND NUCLEIC ACIDS FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Titre : METHODE D'INDUCTION D'UNE ACTIVITE ARNi SPECIFIQUE DANS DES CELLULES ET ACIDES NUCLEIQUES POUR SA MISE EN OEUVRE

(57) Abstract: The present invention relates to a method for inducing an activity of a specific RNAi in eukaryotic cells, into which the TAT protein and a nucleic acid are introduced, said nucleic acid coding for a nucleotide sequence which comprises the sense and antisense sequences of an RNAi of interest. Said sense and antisense sequences are separated by a separating nucleotide sequence, coding for a sequence which comprises at least the minimum TAR sequence which is recognised by the TAT protein, said transcribed separating sequence and the TAT protein forming a complex which inhibits the activity of the RNAi of interest. The RNAi activity is then induced, by removing the TAT protein.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet une méthode d'induction d'une activité d'un ARNi spécifique dans des cellules eucaryotes dans lesquelles on introduit la protéine TAT et un acide nucléique codant pour une séquence nucléotidique comprenant les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique séparatrice codant pour une séquence comprenant au moins la séquence TAR minimale reconnue par la protéine TAT, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant un complexe inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt et on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

WO 2005/040385 A1

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

**LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS
COMPREND PLUS D'UN TOME.**

CECI EST LE TOME __1__ DE __2__

NOTE: Pour les tomes additionels, veuillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

**THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE
THAN ONE VOLUME.**

THIS IS VOLUME __1__ OF __2__

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

METHODE D'INDUCTION D'UNE ACTIVITE ARNi SPECIFIQUE DANS DES CELLULES ET ACIDES NUCLEIQUES POUR SA MISE EN ŒUVRE

L'invention concerne le domaine de la biologie et plus particulièrement la préparation d'oligonucléotides, double brin, destinés à être utilisés dans un processus d'interférence ARN (RNAi ou ARNi) dans le but d'induire la dégradation d'un ARN cible.

L'interférence ARN désignée aussi « RNAi » ou encore co-suppression, a été mise en évidence dans les plantes, où il a été observé que l'introduction d'un long ARN double brin, correspondant à un gène, induit la répression spécifique et efficace de l'expression du gène ciblé. Le mécanisme de cette interférence comporte la dégradation de l'ARN double brin en courts duplex d'oligonucléotides d'environ 20 à 22 nucléotides appelés siRNAs.

L'interférence ARN a maintenant été appliquée aux mammifères pour inhiber spécifiquement l'expression des gènes pour des applications en génétique fonctionnelle. En effet, les siRNAs permettent d'identifier la fonction des gènes mis en évidence par le séquençage du génome humain, soit dans des modèles de culture cellulaire, soit dans des modèles animaux en particulier chez la souris. L'interférence ARN est aussi utile dans le domaine thérapeutique pour le traitement ou la prévention de cancers, de maladies infectieuses et plus généralement de maladies mettant en jeu un gène hétérologue ou homologue muté (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 ; Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-6888).

Les siRNAs sont de courtes séquences d'ARN double brin, qui peuvent être introduites dans les cellules sous forme d'oligonucléotides synthétiques ou sous forme de vecteurs permettant l'expression de ces siRNAs. Dans cette dernière approche, le siRNA est synthétisé sous la forme d'un

précurseur qui est un shRNA (short hairpin RNA), formé d'une "tige boucle" dans laquelle la tige représente le siRNA et la boucle une séquence quelconque qui sera dégradée par les RNAases cellulaires, ce qui va donner naissance au siRNA mature.

5 La mise en œuvre de vecteurs d'expression de siRNAs présente de nombreux avantages, en particulier pour les applications de génétique fonctionnelle. Elle permet d'exprimer l'ARN double brin de manière stable dans les cellules, et donc d'inhiber plus facilement l'expression des protéines à
10 de 3 jours dans les cellules de mammifères. De plus, les siRNA sont dilués au cours des divisions cellulaires.

Elle permet aussi d'analyser des effets à long terme. Par contre, elle nécessite d'établir des lignées exprimant la construction de manière stable, ce qui présente plusieurs inconvénients. En particulier, il faut comparer des lignées
15 stables entre elles, ce qui est en général difficile d'interprétation parce que les lignées cellulaires dérivent. D'autre part, il est impossible d'étudier les protéines indispensables pour la cellule, puisque leur inhibition bloquera la prolifération des cellules et empêchera donc l'établissement de la lignée stable. Il est donc indispensable de pouvoir induire l'activité du siRNA. On entend par induire
20 l'activité du siRNA pouvoir bloquer et débloquent son activité à volonté. On entend par activité du siRNA sa capacité à reconnaître et à induire la dégradation de son ARN cible.

Il est décrit dans l'art antérieur un vecteur permettant l'expression stable et inductible de siRNA. Ce système est basé sur l'inhibition de la
25 transcription du précurseur du siRNA. En effet, le vecteur, dérivé du vecteur pSUPER (Brummelkamp T. R et al., www.sciencexpress.org/21_March_2002/page_1/10.1126/science.1068999), contient une séquence connue, "l'opérateur tetracycline" ("opérateur TET"), positionnée entre le promoteur dirigeant la transcription du siRNA et la séquence codant ledit siRNA. En
30 présence de la protéine "répresseur TET", celle-ci se fixe sur "l'opérateur TET" et bloque ainsi la transcription du siRNA. En présence de doxycycline, celle-ci

inhibe la fixation de la protéine "répresseur TET", sur "l'opérateur TET" et permet donc la transcription du siRNA. Ce système d'expression engendre un bruit de fond d'activité relativement élevé.

De plus, les systèmes inductibles basés sur les promoteurs
5 fonctionnent très mal dans les vecteurs viraux, parce que les promoteurs viraux prennent le pas sur les promoteurs inductibles et le bruit de fond est très élevé.

L'invention vise précisément à palier ces inconvénients en offrant un système permettant d'induire à volonté l'activité d'un siRNA.

Ce but est atteint par la présente invention grâce à l'emploi du couple
10 protéine TAT-séquence ARN TAR pour bloquer l'activité d'un siRNA dans des cellules de mammifères.

Le principe de l'invention est basé sur l'interaction TAT/TAR. En effet, le siRNA doit être reconnu dans la cellule par un complexe protéique, appelé complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), qui va lui faire subir
15 une étape de maturation et l'utiliser comme guide pour reconnaître et dégrader le mRNA cible. La protéine TAT peut être utilisée pour bloquer cette dernière étape.

La protéine TAT du VIH joue un rôle crucial dans la réplication virale. En effet, en tant que facteur de transcription, TAT régule la vitesse de
20 réplication du virus. TAT est une protéine sécrétée capable de diffuser dans les cellules non-infectées et de préparer un environnement propice à l'infection virale. La protéine TAT existe sous deux formes (71 et 101 acides aminés) codées par deux exons séparés par le gène *env*. TAT exerce sa fonction d'activateur du promoteur du VIH en se liant à la séquence d'ARN TAR
25 présente en 5' de tous les ARN du VIH.

La liaison de TAT et de ses co-activateurs transcriptionnels cellulaires à l'ARN TAR va stimuler l'élongation de la transcription en augmentant la processivité de l'ARN polymérase II.

La présence d'ARNs double brins dans une cellule représente un
30 signal : il met en jeu une RNaseIII nommée Dicer. Cette ribonucléase coupe les longs ARN double brin en petits fragments d'ARN double brin, les siRNAs, de

taille et de structure précises, en général 21 à 23 nucléotides. Les siRNAs duplexes s'associent ensuite avec des protéines pour former un complexe nommé RISC (pour « *RNA-Induced Silencing Complex* »). RISC est donc un complexe ribonucléoprotéique contenant une molécule de siRNA associée à des protéines appartenant à la famille Argonaute. RISC guide, grâce à l'extrémité 5'Phosphate d'un siRNA simple brin, les petits siRNAs pour la reconnaissance spécifique de la séquence de l'ARN messenger cible et catalyse son clivage ; cette réaction a lieu dans le cytoplasme. Cela aboutit à l'inhibition de la traduction et ainsi à l'inhibition de l'expression du gène cible.

10 Selon l'invention, la boucle du précurseur du siRNA (shRNA), normalement constituée de séquence quelconque, est remplacée par une séquence nucléotidique codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT.

15 Ladite séquence référencée dans la liste de séquences soumise en annexe sous le numéro SEQ ID N° 1, est composée de 11 nucléotides et présente l'enchaînement suivant : ATCTGAGCTCT (ou AUCUGAGCUCU sous sa forme ARN).

20 Il est également possible d'utiliser selon l'invention, une séquence codant pour la totalité de la séquence TAR sauvage ou mutée ou tout fragment de celle-ci contenant ladite séquence en nucléotides, minimale non-mutée ci-dessus décrite. Cette séquence (ADN ou ARN) est dénommée par ailleurs dans le texte séquence séparatrice.

25 La séquence séparatrice utilisée selon l'invention peut être naturelle ou synthétique.

Ainsi, en présence de la protéine TAT, celle-ci interagit avec la boucle TAR sur le shRNA, et l'interaction du siRNA avec le complexe protéique de maturation (complexe RISC) ne peut se réaliser et le siRNA ne subit pas les étapes de maturation induites par ledit complexe et reste donc inactif c'est-à-dire sous la forme shRNA.

30 En l'absence de la protéine TAT, la boucle TAR du shRNA est

dégradée et le siRNA résultant est accessible au complexe de maturation RISC et le processus de dégradation de l'ARN cible par l'ARNi peut ainsi s'effectuer.

L'invention a donc pour objet une méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules dans laquelle :

- 5 - on introduit dans des cellules eucaryotes la protéine TAT et un acide nucléique codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1 dans la
10 liste de séquences fournie en annexe, codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT, dans des conditions où l'acide nucléique est transcrit en ARN, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant
15 un complexe inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt ;
- on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

La séquence séparatrice peut être constituée par toute séquence nucléotidique pourvu qu'elle comprenne au moins la séquence SEQ ID N°1. Avantageusement la séquence séparatrice est constituée d'une séquence
20 codant pour la séquence TAR complète, sauvage ou mutée, ou d'un fragment de celle-ci comprenant une séquence codant pour la séquence SEQ ID N°1.

Selon une forme particulière de mise en œuvre de la méthode de l'invention, ledit acide nucléique codant pour les séquences comprenant les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt séparées par la séquence
25 séparatrice ci-dessus décrite peut être introduite dans la cellule sous la forme d'un vecteur d'expression, particulièrement sous la forme d'un plasmide ou d'un vecteur viral.

Dans cette forme de réalisation, l'ARNi d'intérêt sera transcrit à partir du vecteur codant pour le shRNA qui va donner naissance au siRNA après
30 clivage de la séquence séparatrice simple brin. Ainsi, le vecteur comprend au moins une séquence en nucléotides codant pour les séquences sens et

antisens du siRNA séparées par une séquence nucléotidique comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1, sous la dépendance d'un promoteur de transcription.

Ledit acide nucléique décrit ci-dessus permet la mise en œuvre de la
5 méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules eucaryotes.

Le vecteur peut en outre comprendre un gène de résistance à un antibiotique. Avantageusement selon l'invention, le gène de résistance à un antibiotique est un gène de résistance à la néomycine.

La présence d'un gène de résistance à un antibiotique, comme la
10 néomycine, permet de sélectionner les cellules transfectées.

Selon l'invention, lorsque les cellules sont des cellules en culture, la protéine TAT peut être introduite dans lesdites cellules par simple culture des cellules dans un milieu comprenant la protéine TAT.

En effet, un avantage de la présente invention réside dans le fait que
15 la protéine TAT pénètre spontanément dans les cellules lorsque celles-ci sont cultivées dans un milieu de culture contenant la protéine TAT. Il est donc facile de bloquer l'action du siRNA, comprenant la séquence séparatrice TAR telle que décrite précédemment, en cultivant les cellules contenant le siRNA dans un milieu de culture contenant de la protéine TAT, et de stimuler l'activité de l'ARNi
20 en cultivant lesdites cellules dans un milieu de culture sans protéine TAT, ce qui conduira à la dégradation de l'ARN cible par le l'ARNi.

Dans ces conditions le milieu de culture peut contenir la protéine TAT en une concentration comprise entre 0,1 $\mu\text{g/ml}$ et 5 $\mu\text{g/ml}$ préférentiellement 0,5 $\mu\text{g/ml}$ et 1,5 $\mu\text{g/ml}$ et très préférentiellement 1 $\mu\text{g/ml}$.

La protéine TAT peut aussi être introduite dans la cellule sous la
25 forme d'un vecteur d'expression inductible comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine TAT. Dans ce cas, l'expression de la protéine pourra être induite ce qui aura comme conséquence d'inhiber l'activité de l'ARNi et donc de bloquer la dégradation de l'ARN cible par l'ARNi. La
30 dégradation de l'ARN cible par l'ARNi pourra alors être induite lorsque la

synthèse de la protéine TAT sera elle-même bloquée.

Selon l'invention, les cellules transfectées avec l'acide nucléique selon l'invention sont des cellules de mammifères. La méthode s'applique aussi bien à la transfection de cellules en culture que directement chez l'animal.

5 L'invention permet d'analyser de manière fiable les gènes, particulièrement les gènes humains d'un point de vue fonctionnel, dans des cellules en culture ou dans des animaux, en particulier dans des souris.

L'invention se rapporte encore à une cellule ou une lignée de cellules dans laquelle un acide nucléique selon l'invention, tel que décrit précédemment
10 a été introduit.

L'invention se rapporte aussi aux animaux comprenant des cellules dans lesquelles l'acide nucléique selon l'invention tel que décrit précédemment a été introduit.

L'invention a enfin pour objet des compositions, notamment
15 pharmaceutiques, comprenant comme substance active au moins un acide nucléique selon l'invention tel que décrit précédemment ou des cellules contenant ledit acide nucléique, telles que décrites précédemment, éventuellement associées dans la composition à un excipient compatible.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des
20 exemples qui suivent et dans lesquels il sera fait référence au dessin en annexe dans lequel la figure 1 représente l'inhibition du marqueur GFP par l'ARNi.

Exemple 1 : construction du plasmide pTATOF-siRNAGFP codant pour un ARNi dont la cible est l'ARN messenger codant pour la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein : GFP) :

25 Ce plasmide est construit à partir du plasmide pSUPER, permettant l'expression constitutive de siRNA et décrit par Brummelkamp et al.

La séquence d'ADN (oligonucléotide ADN synthétique synthétisé à façon), contenant dans l'ordre les séquences SEQ ID N°2 (codant pour le siRNA sens)-SEQ ID N°1 (codant pour la séquence séparatrice)-SEQ ID N°3
30 (codant pour le siRNA anti-sens) est introduite immédiatement en aval du

promoteur H1 du plasmide pSuper aux sites Bgl II en 5', et Hind III en 3'. On obtient ainsi le vecteur d'expression pTATOF-siRNAGFP.

(SEQ ID NO. 2) codant pour le siRNA sens : 5' GCAAGCTGACCCTGAAGTTC 3' 3' CGTTCGACTGGGACTTCAAG 5'
séquence codant pour la séquence séparatrice (SEQ ID NO. 1) 5' ATCTGAGCTCT 3' 3' TAGACTCGAGA 5'
(SEQ ID NO. 3) codant pour le siRNA anti-sens : 5' GAACTTCAGGGTCAGCTTGC 3' 3' CTTGAAGTCCCAGTCGAACG 5'

Ainsi, les séquences codant pour les siRNA sens et anti-sens sont
5 séparées par une boucle TAR minimale, codée par la séquence séparatrice
nommée SEQ ID NO.1, codant pour la séquence minimale reconnue par la
protéine TAT (SEQ ID NO. 4).

10	Codant pour le SiRNA :	
	5'	3'
	GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGAGCTCTGAACTTCAGGGTCAGCTTGC	
	CGTTCGACTGGGACTTCAAGTAGACTCGAGACTTGAAGTCCCAGTCGAACG	
	3'	5'
	Codant pour le SiRNA complémentaire :	

15 Exemple 2 : inhibition de l'expression de la GFP par le siRNAGFP
exprimé par le vecteur de l'exemple 1 :

Des cellules de mammifères COS-7 sont transfectées avec du
polyfect (Qiagen) avec 4 µg de vecteurs d'expression des siRNA
(pTATOFsiRNAGFP, partie A, ou pSuper siRNAGFP sans boucle TAR, partie
20 B), ainsi qu'un vecteur d'expression de la Green Fluorescent Protein ou GFP
(500 ng). Soixante heures après la transfection, un western blot a été réalisé à
partir des extraits totaux en utilisant un anticorps dirigé contre la GFP (Santa
cruz) ou la tubuline cellulaire (Sigma) afin d'évaluer la quantité de protéines
utilisée pour ce test.

25 Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) contenant
10% de sérum de veau foetal en présence (wt) ou en l'absence (-) d'un vecteur

d'expression (0,5 µg) de la protéine TAT ou de ses mutants, co-transfectés (Bres V, et al. *Nat Cell Biol.* 2003 Aug;5(8):754-61).

Un témoin est réalisé avec des cellules n'ayant pas reçu le vecteur d'expression des siRNA (pTATOF-siRNAGFP ou pSuper siRNAGFP), cultivées
5 en l'absence de protéine TAT. De même des témoins sont réalisés avec un vecteur d'expression de la protéine TAT mutée (incapable de lier la séquence TAR) en présence du vecteur d'expression des siRNA (pTATOF-siRNAGFP ou pSuper siRNAGFP).

La Figure 1 montre les résultats de cette expérience :

10 Partie A :

En l'absence de protéine TAT et de vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est présente dans les cellules (colonne 1).

En l'absence de protéine TAT et en présence du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est dégradée (colonne 2).

15 En présence de protéine TAT sauvage et du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est présente dans les cellules (colonne 3) en quantité comparable à celle présente dans les cellules n'ayant pas reçu de protéine TAT ni de vecteur pTATOF-siRNAGFP (colonne 1), et n'est donc pas dégradée.

20 En présence de protéine TAT mutée et du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est dégradée dans les cellules (colonne 4 et 5).

Partie B :

En l'absence de protéine TAT et de vecteur pSupersiRNAGFP (sans séquence TAR), la GFP est présente dans les cellules (colonne 1).

25 En l'absence de protéine TAT et en présence du vecteur pSupersiRNAGFP, la GFP est dégradée (colonne 2).

En présence de protéine TAT sauvage ou mutée et du vecteur pSupersiRNAGFP,) la GFP est dégradée dans les cellules (colonne 1, 4 et 5).

Ceci démontre que la protéine TAT sauvage reconnaît la séquence séparatrice intercalée entre les séquences sens et antisens de siRNA et bloque

son activité alors qu'une protéine TAT mutée, incapable de reconnaître la séquence séparatrice n'a pas d'effet sur le siRNA qui apparaît parfaitement fonctionnel.

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

**LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS
COMPREND PLUS D'UN TOME.**

CECI EST LE TOME __1__ DE __2__

NOTE: Pour les tomes additionels, veuillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

**THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE
THAN ONE VOLUME.**

THIS IS VOLUME __1__ OF __2__

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

REVENDICATIONS

1) Méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules dans laquelle :

- 5 - on introduit dans des cellules eucaryotes la protéine TAT et un acide nucléique codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique (séquence séparatrice) comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1 dans
10 la liste de séquence fournie en annexe, codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT, dans des conditions où l'acide nucléique est transcrit en ARN, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant un complexe
15 inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt ;
- on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprenant les séquences codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt séparées par la séquence séparatrice est introduite
20 dans la cellule sous la forme d'un vecteur.

3) Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit vecteur est un plasmide ou un vecteur viral.

4) Méthode selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est sous la dépendance d'un promoteur de
25 transcription.

5) Méthode selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comporte en outre un gène de résistance à un antibiotique.

6) Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le gène
30 de résistance à un antibiotique est un gène de résistance à la néomycine.

7) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les cellules transfectées sont des cellules de mammifères.

8) Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes par cultures desdites cellules dans un milieu de culture contenant ladite protéine TAT.

9) Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en cultivant les cellules eucaryotes dans un milieu ne contenant pas de protéine TAT.

10) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes en introduisant dans lesdites cellules un vecteur inducible comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine TAT.

11) Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en bloquant la synthèse de la protéine TAT.

12) Un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

13) Une cellule ou une lignée de cellules transfectées par un acide nucléique selon la revendication 12.

14) Composition notamment pharmaceutique comprenant comme substance active au moins un acide nucléique selon la revendication 12 ou une cellule ou lignée de cellules selon la revendication 13, éventuellement associée dans la composition à un excipient compatible.

1/1



Figure 1